



Universidade Federal do Rio Grande do Norte  
Centro de Tecnologia  
Departamento de Engenharia Química  
Programa de Pós-graduação em Engenharia Química



## DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

# **AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO PLASMÍDEO pQE-30 E EXPRESSÃO DO ANTÍGENO 503 DE *LEISHMANIA I.* *CHAGASI* EM *ESCHERICHIA COLI* M15 EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE IPTG E TEMPERATURAS DE CULTIVO**

Vitor Troccoli Ribeiro

Orientador: Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos

Natal/RN  
Fevereiro/2018

**Vitor Troccoli Ribeiro**

**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO PLASMÍDEO pQE-30 E  
EXPRESSÃO DO ANTÍGENO 503 DE *LEISHMANIA I. CHAGASI*  
EM *ESCHERICHIA COLI* M15 EM DIFERENTES  
CONCENTRAÇÕES DE IPTG E TEMPERATURAS DE CULTIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, sob a orientação do Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos

Natal/RN  
Fevereiro/2018

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN  
Sistema de Bibliotecas - SISBI  
Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Central Zila Mamede

Ribeiro, Vitor Troccoli.

Avaliação da estabilidade do plasmídeo pQE-30 e expressão do antígeno 503 de *Leishmania i. chagasi* em *Escherichia coli* M15 em diferentes concentrações de IPTG e temperaturas de cultivo / Vitor Troccoli Ribeiro. - 2018.  
89 f.: il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Natal, RN, 2018.

Orientador: Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos.

1. *Leishmania i. chagasi* - Dissertação. 2. Indução - Dissertação. 3. Temperatura - Dissertação. 4. Antígeno 503 - Dissertação. 5. Estabilidade plasmidial - Dissertação. I. Santos, Everaldo Silvino dos. II. Título.

RN/UF/BCZM

CDU 616.993.161

**RIBEIRO, Vitor Troccoli** – Avaliação da estabilidade do plasmídeo pQE-30 e expressão do antígeno 503 de *Leishmania i. chagasi* em *Escherichia coli* M15 em diferentes concentrações de IPTG e temperaturas de cultivo. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Área de Concentração: Engenharia Química, Linha de Pesquisa: Processos Químicos, catalíticos e biotecnológicos, 2017, Natal/RN, Brasil.

**Orientador:** Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos

**RESUMO:** A leishmaniose visceral é uma doença infecto-parasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania*, podendo ser letal quando não há tratamento adequado. Estima-se que existem 12 milhões de pessoas infectadas pela doença, mas infelizmente não há nenhuma vacina capaz de prevenir a doença. Ademais, o tratamento da doença apresenta alto custo e elevada toxicidade. Diante disso, deve-se destacar a pesquisa de componentes antigênicos purificados que possam ser utilizados como ferramenta para obtenção de vacinas ou testes para diagnóstico específico. Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a influência da concentração de IPTG durante a indução e a influência da temperatura de cultivo na expressão do antígeno 503 e na estabilidade do plasmídeo pQE-30 em *Escherichia coli*. Todos os ensaios foram realizados em incubador rotativo e feitos em duplicata. Primeiramente foram realizados cultivos induzidos com IPTG nas concentrações de: 0,01 mM; 0,1 mM; 0,5 mM; 1,0 mM e 1,5 mM na temperatura de 37 °C. A concentração de indutor não afetou a estabilidade do plasmídeo e quando induzido com 1,0 mM, a expressão de antígeno 503 máxima foi de  $0,101 \pm 0,004$  g/L. Foi possível verificar que a menor concentração de IPTG utilizada foi o suficiente para conseguir a expressão da proteína recombinante. Em seguida, a concentração de IPTG foi fixada em 1,0 mM e avaliadas as temperaturas de cultivo de 27, 32 e 42 °C. Estes ensaios foram comparados com o ensaio realizado anterior a 37 °C. A temperatura influenciou a estabilidade do plasmídeo, sendo que quanto menor a temperatura de cultivo, maior estabilidade. De acordo com os resultados, foi possível verificar que a temperatura de 37 °C obteve maior expressão do antígeno 503, sendo considerada portanto, as condições ótimas para produção de antígeno 503 em incubador rotativo.

**Palavras-chave:** *Leishmania i. chagasi*, indução, temperatura, antígeno 503, estabilidade plasmidial.

**Vitor Troccoli Ribeiro**

**Avaliação da estabilidade do plasmídeo pQE-30 e expressão do antígeno 503 de *Leishmania i. chagasi* em *Escherichia coli* M15 em diferentes concentrações em IPTG e temperaturas de cultivo**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química, sob orientação da Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos.

Aprovado (a) em 23 / fevereiro / 2018.



Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos  
Orientador – UFRN



Prof. Dr. Francisco Canindé de Sousa Júnior  
Membro interno – UFRN



Prof. Dr. Michelle Rossana Ferreira Vaz  
Membro externo – UFPR

**RIBEIRO, Vitor Troccoli** – Avaliação da estabilidade do plasmídeo pQE-30 e expressão do antígeno 503 de *Leishmania i. chagasi* em *Escherichia coli* M15 em diferentes concentrações de IPTG e temperaturas de cultivo. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Área de Concentração: Engenharia Química, Linha de Pesquisa: Processos Químicos, catalíticos e biotecnológicos, 2017, Natal/RN, Brasil.

**Orientador:** Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos

### ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is an infectious-parasitic disease caused by protozoa of the genus *Leishmania*, which can be lethal when there is no adequate treatment. It is estimated that there are 12 million people infected by the disease, but unfortunately there is no vaccine capable of preventing the disease. In addition, the treatment of the disease presents high cost and high toxicity. Therefore, we must highlight the research of purified antigenic components that can be used as a tool to obtain vaccines or tests for specific diagnosis. In this context, the present work aims to evaluate the influence of the concentration of IPTG during the induction and the influence of culture temperature on 503 antigen expression and on the stability of plasmid pQE-30 in *Escherichia coli*. All assays were performed in a rotary incubator and made in duplicate. First, IPTG induced cultures were carried out at concentrations of: 0.01 mM; 0.1 mM; 0.5 mM; 1.0 mM and 1.5 mM at 37 °C. The concentration of the inducer did not affect the stability of the plasmid and when induced with 1.0 mM, the 503 antigen expression was maximal  $0.101 \pm 0.004$  g / L. It was possible to verify that the lowest concentration of IPTG used was enough to achieve expression of the recombinant protein. Thereafter, the concentration of IPTG was fixed at 1.0 mM and the cultivation temperatures of 27, 32 and 42 °C were evaluated. These assays were compared with the previous assay performed at 37 °C. Temperature influenced the stability of the plasmid, and the lower the culture temperature, the greater the stability. According to the results, the temperature of 37 °C obtained the highest expression of 503 antigen, being considered therefore, the optimal conditions for 503 antigen production in a rotary incubator.

**Keywords:** *Leishmania i. chagasi*, induction, temperature, 503 antigen, plasmidial stability.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, pela saúde, conhecimento e força.

Aos meus pais, por acreditarem na minha capacidade e potencial.

Ao Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos, pela orientação durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Francisco Canindé de Sousa Junior, pela disponibilidade, orientação e atenção que me foi dada durante este trabalho.

Ao meu amor, José Daladiê Barreto da Costa Filho, por todo o carinho que você me dá, apoio, companheirismo e amizade.

Aos colegas do LEB, pelas boas risadas, companhia e pela ajuda durante este trabalho.

À bolsista de iniciação científica Estéfani Asevedo, pela imensa ajuda durante a realização deste trabalho.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

## SUMÁRIO

1. Introdução.....	15
2. Objetivos.....	19
2.1 Objetivo geral .....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3. Revisão Bibliográfica .....	21
3.1 Leishmaniose visceral .....	21
3.1.1 Situação epidemiológica.....	22
3.1.2 Agente etiológico e transmissão .....	22
3.1.3 Quadro clínico .....	23
3.1.4 Diagnóstico e tratamento .....	23
3.2 Antígeno 503 .....	24
3.3 Engenharia genética e DNA recombinante .....	24
3.3.1 Clonagem gênica .....	25
3.4 Estabilidade do plasmídeo.....	26
3.5 Indução e expressão de proteínas recombinantes em <i>E. coli</i> .....	30
3.6 Condições de cultivo e formação de ácido acético.....	34
3.7 Recuperação e purificação de biomoléculas recombinantes .....	36
3.7.1 Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) .....	37
4. Material e métodos .....	40
4.1 Microrganismo .....	40
4.2 Meio de cultivo.....	40
4.2.1 Antibióticos .....	40
4.3 Preparo do inóculo.....	41
4.4 Cultivo em incubador rotativo.....	41
4.5 Avaliação da concentração de IPTG em incubador rotativo .....	41



4.6 Avaliação da temperatura de indução em incubador rotativo .....	42
4.7 Métodos analíticos .....	42
4.7.1 Determinação da estabilidade do plasmídeo .....	43
4.7.2 Concentração celular .....	44
4.7.3 Determinação do pH .....	44
4.7.4 Rompimento celular .....	44
4.7.5 Determinação da concentração de ácido acético .....	45
4.7.6 Purificação por Cromatografia de Afinidade por Metal Imobilizado (IMAC) .....	45
4.7.7 Determinação da concentração de proteínas totais .....	46
4.7.8 Eletroforese de proteínas sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) .....	46
4.7.9 Análise quantitativa de antígeno 503 .....	47
4.8 Obtenção dos parâmetros cinéticos .....	48
4.8.1 Cálculo de velocidades específicas .....	48
4.8.2 Determinação da fase exponencial de crescimento celular .....	48
4.8.3 Fator de conversão .....	48
4.8.4 Produtividade em biomassa ( $P_x$ ) e produtividade em produto ( $P_p$ ) .....	49
5. Resultados e Discussão .....	51
5.1 Cultivos para a avaliação do crescimento celular de <i>E. coli</i> , expressão do antígeno 503 e estabilidade do plasmídeo utilizando utilizando diferentes concentrações de IPTG .....	51
5.2 Cultivo para a avaliação do crescimento celular de <i>E. coli</i> e estabilidade do plasmídeo sem adição de indutor .....	58
5.3 Cultivos para a avaliação do crescimento celular de <i>E. coli</i> , expressão do antígeno 503 e estabilidade do plasmídeo utilizando diferentes temperaturas de cultivo .....	60
5.4 Avaliação da expressão da proteína recombinante por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE .....	67
6. Conclusões .....	71
Referências bibliográficas .....	73
Apêndice .....	88

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Endemicidade da leishmaniose visceral em todo o mundo no ano de 2015.....	21
Figura 2 - Fêmea de Flebotomíneo adulto, engurgitada.....	23
Figura 3 - Ligação do vetor com o inserto para formar a molécula de DNA recombinante ....	25
Figura 4 - Transformação de uma célula com uma construção de DNA recombinante.....	26
Figura 5 - Ilustração do plasmídeo pREP4.....	29
Figura 6 - Ilustração do plasmídeo pQE-30 .....	29
Figura 7 - Ilustração das estruturas de IPTG e lactose, respectivamente .....	32
Figura 8 – Esquema com a ilustração do funcionamento do <i>operon lac</i> . A) Na ausência de indutor. B) Na presença de indutor.....	32
Figura 9 - Ilustração de um esquema simplificado de uma coluna cromatográfica .....	37
Figura 10 – Fluxograma ilustrando etapas e métodos analíticos.....	43
Figura 11 - Perfil do crescimento celular para os cultivos induzidos com diferentes concentrações de IPTG, a 37 °C.....	51
Figura 12 - Perfil da variação do pH durante os cultivos induzidos com diferentes concentrações de IPTG, a 37 °C.....	53
Figura 13 - Perfil da formação de ácido acético durante os cultivos induzidos com diferentes concentrações de IPTG, a 37 °C.....	53
Figura 14 - Perfil da estabilidade do plasmídeo durante os cultivos induzidos com diferentes concentrações de IPTG, a 37 °C.....	55
Figura 15 - Perfil da produção do antígeno 503 durante os cultivos induzidos com diferentes concentrações de IPTG, a 37 °C.....	56
Figura 16 - Perfil da velocidade de crescimento específica durante os cultivos induzidos com diferentes concentrações de IPTG, a 37 °C.....	57
Figura 17 - Perfil do crescimento celular durante os cultivos com indução e sem indução de IPTG, a 37 °C .....	58
Figura 18 - Perfil da estabilidade do plasmídeo durante os cultivos com indução e sem indução de IPTG, a 37 °C.....	60

Figura 19 - Perfil do crescimento celular durante os cultivos com diferentes temperaturas de cultivo, induzidos com 1,0 mM de IPTG .....	61
Figura 20 - Perfil da variação do pH durante os cultivos com diferentes temperaturas de cultivo, induzidos com 1,0 mM de IPTG .....	62
Figura 21 - Perfil da formação de ácido acético durante os cultivos com diferentes temperaturas de cultivo, induzidos com 1,0 mM de IPTG .....	63
Figura 22 - Perfil da estabilidade do plasmídeo durante os cultivos com diferentes temperaturas de cultivo, induzidos com 1,0 mM de IPTG .....	64
Figura 23 - Perfil da produção do antígeno 503 durante os cultivos com diferentes temperaturas de cultivo, induzidos com 1,0 mM de IPTG .....	65
Figura 24 - Perfil da velocidade de crescimento específica durante os cultivos induzidos com diferentes temperaturas, com 1,0 mM de IPTG .....	67
Figura 25 - SDS-PAGE análise da expressão do antígeno 503 de <i>Leishmania i. chagasi</i> em <i>E. coli</i> induzido por diferentes concentrações de IPTG no meio 2xTY. Linha (M): Marcador; Linhas (A-E): proteína eluída na melhor condição dos cultivos A-E, Linha (Bruto): proteínas totais .....	68
Figura 26 - SDS-PAGE análise da expressão do antígeno 503 de <i>Leishmania i. chagasi</i> em <i>E. coli</i> induzido por 1,0 mM de IPTG a diferentes temperaturas no meio 2xTY. Linha (M): Marcador; Linhas (F-H): proteína eluída na melhor condição dos cultivos F-H, Linha (Bruto): proteínas totais .....	69

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fatores que afetam a estabilidade do plasmídeo .....	27
Tabela 2 – Composição do meio de cultivo 2xTY .....	40
Tabela 3 - Cultivos que foram realizados para estudo cinético .....	42
Tabela 4 – Composição do meio de cultivo LB/Ágar .....	44
Tabela 5 – Composição dos tampões para lise e purificação .....	46
Tabela 6 – Condições para produção máxima de antígeno 503 nos cultivos com variação da concentração de IPTG .....	56
Tabela 7 – Parâmetros cinéticos, no instante de indução, dos cultivos com variação da concentração de IPTG .....	58
Tabela 8 – Condições para produção máxima de antígeno 503 nos cultivos induzidos com 1,0 mM em diferentes temperaturas .....	66
Tabela 9 – Parâmetros cinéticos, no instante de indução, dos cultivos induzidos com 1,0 mM em diferentes temperaturas .....	67

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A<sub>PT</sub>: Área de proteína total

A<sub>PI</sub>: Área de proteína de interesse

BSA: Albumina de Soro Bovino

C<sub>a503</sub>: Concentração do antígeno 503

C<sub>PT</sub>: Concentração de proteínas totais

DNA: Ácido desoxirribonucleico

*E. coli*: *Escherichia coli*

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

IMAC: Cromatografia de Afinidade por Íons Metálicos Imobilizados

IPTG: isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo

kDa: kiloDalton

LV: Leishmaniose Visceral

mM: milimolar

MS: Massa Seca

OD<sub>600nm</sub>: Densidade Ótica medida no comprimento de onda de 600 nanômetros

pH: Potencial Hidrogeniônico

P<sub>x</sub>: Produtividade em células (biomassa)

P<sub>p</sub>: Produtividade em produto

RNA: Ácido ribonucleico

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes

WHO: Organização Mundial da Saúde

Y<sub>P/X</sub>: Fator de conversão de células em produto

%: Porcentagem

°C: Graus Celsius

μ<sub>p</sub>: Velocidade específica de formação de produto

μ<sub>x</sub>: Velocidade específica de crescimento celular

μ<sub>máx</sub>: Velocidade máxima específica de crescimento celular

---

---

# Capítulo 1

## Introdução

---

---

# 1. Introdução

A leishmaniose é uma doença endêmica com um quadro clínico complexo. Estima-se que ocorram anualmente de 900 mil a 1,3 milhões de casos com mais de 20 mil mortes devido à doença. Sem o tratamento, as chances de óbito são elevadas a 90% (WHO, 2017). No Brasil, o número de casos de leishmaniose vem aumentando aceleradamente nas últimas três décadas devido à urbanização. A forma visceral da doença (leishmaniose visceral), também conhecida como calazar, é considerada uma das seis parasitoses mais importantes em humanos (Ettinger *et al.*, 2009).

A LV apresenta uma incidência de 200.000 a 400.000 novos casos por ano (WHO, 2017) e exibe uma extensa distribuição nos continentes asiático, africano e americano. Na América Latina, 90% dos casos ocorrem no Brasil, principalmente na região Nordeste, que responde por cerca de 70 a 90% da população infectada (Ministério da Saúde, 2014). As capitais do Nordeste, em sua maioria, localizam-se no litoral, tendo uma alta pluviosidade, clima úmido e altas temperaturas, condições que favorecem a proliferação dos vetores da doença, os insetos flebotomíneos e, consequentemente, aumentam o risco de pessoas que habitam esta região serem infectadas (Cavalcante & Vale, 2014).

Apesar do número de pessoas expostas ao risco de infecção, da alta incidência e do avanço expressivo dos estudos, não há nenhuma droga capaz de prevenir a LV em humanos. Os fármacos de eleição para o tratamento da leishmaniose são os antimoniais pentavalentes, como o antimoniato N-metilglucamina e estibogluconato de sódio (Singh *et al.*, 2016). Em casos de resistência aos antimoniais, o medicamento de segunda linha é a anfotericina B (Pace, 2014). Devido a toxicidade e ao alto custo das drogas utilizadas para o diagnóstico e tratamento da leishmaniose, faz-se necessário a busca de alternativas que sejam eficazes e menos tóxicas ao organismo (Selvapandiyan *et al.*, 2012). Assim, existe um empenho particular na produção de antígenos específicos por meio de microrganismos recombinantes tendo em vista a produção de vacinas e *kits* para diagnóstico (Sousa Junior *et al.*, 2015). Nesse contexto, destaca-se o avanço da engenharia genética nas últimas décadas, tendo como objetivo principal a viabilização da síntese de proteínas heterólogas (Alberts, 2011). De acordo com o estudo realizado por Martins *et al.* (2006), o antígeno 503, uma proteína com massa molecular de aproximadamente 56 kDa, foi testado frente ao soro de indivíduos com LV, e foi observada uma resposta imune celular e humoral, confirmando o potencial da proteína como candidata a vacina ou testes para *kits* de diagnóstico da doença.

Por outro lado, o uso da bactéria *Escherichia coli* como hospedeiro para o vetor de expressão apresenta-se como uma alternativa viável, uma vez que essa bactéria é bem caracterizada em termos de genética molecular, fisiologia e sistemas de expressão (Noor *et al.*, 2013). O conhecimento do genoma microbiano permitiu que diferentes técnicas de manipulação genética pudessem ser desenvolvidas e aprimoradas (Tian *et al.*, 2011). Além disso, para tornar a produção da proteína heteróloga viável em larga escala, o desenvolvimento do processo de produção é uma etapa importantíssima a ser estudada. Neste sentido, muitos estudos têm sido realizados para a obtenção de um alto nível de produtividade e produção de proteínas heterólogas objetivando aumentar a produção e reduzir custos. A expressão das proteínas em *E. coli* é influenciada por diversos fatores, dentre eles destaca-se a temperatura, condições de aeração, composição do meio de cultivo, além do tipo e concentração do indutor empregado (Noor *et al.*, 2013; Vaz *et al.*, 2015).

A expressão de genes em linhagens de *E. coli* geralmente necessita de indução, podendo ser realizada por compostos como o isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG), um composto químico equivalente à lactose, que representa uma das moléculas mais utilizadas na indução dos variados sistemas de expressão heteróloga sendo utilizado largamente nos processos em que se utiliza o *operon lac* (Zanfonato, 2012). O IPTG é um dos indutores mais utilizados em sistemas de alta expressão, porém apresenta como desvantagem a alta toxicidade, o que interfere negativamente no crescimento celular, que pode limitar a produção de uma proteína de interesse em escala industrial (Einsfeldt *et al.*, 2011). A estratégia de indução empregando IPTG pode variar tanto em concentrações do indutor, fase da indução, temperatura e tempo de indução. Essas condições devem ser testadas e otimizadas, pois dependerão da proteína recombinante a ser produzida, da cepa de *E. coli*, do meio de cultivo empregado, entre outros fatores que são específicos de cada processo (Wandrey *et al.*, 2016).

Um fator determinante para uma célula bacteriana recombinante expressar a proteína heteróloga é a sua capacidade de manter os plasmídeos ao longo do cultivo, também conhecida como estabilidade plasmidial. A instabilidade provoca uma redução na expressão da proteína recombinante, causando impacto negativo na produtividade das proteínas e aumento nos custos de produção. A instabilidade pode ser causada pela perda do plasmídeo durante a divisão celular, na qual as células filha não conseguem manter o plasmídeo das células mãe. A temperatura de cultivo, o pH, o tipo de indutor utilizado, a estirpe hospedeira, a concentração de oxigênio e a composição do meio de cultivo são alguns dos fatores que podem influenciar na estabilidade do plasmídeo (Chen *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2009a; Bhaduri, 2011). Essas condições também precisam ser estudadas e otimizadas caso



a caso, pois cada plasmídeo reage de uma maneira diferente frente às variáveis do processo (Tomazetto *et al.*, 2007).

É importante ressaltar, também, que a temperatura ótima de crescimento de *E. coli* é 37 °C, coincidindo com a temperatura ótima de indução do *operon lac*. Altas temperaturas favorecem um crescimento celular acelerado, porém não favorecem a produção da proteína pois a estabilidade do plasmídeo é afetada pela temperatura. Dessa maneira a diminuição da temperatura de cultivo pode ser uma maneira de aumentar a produção de proteínas, uma vez que a redução da temperatura de cultivo pode permitir um aumento na solubilidade proteica e limitar sua degradação por proteases do choque térmico. (Vaz, 2011).

Destaca-se que o grupo de Engenharia de Bioprocessos da Universidade Federal do Rio Grande do Norte já vem desenvolvendo diversos estudos nessa linha de pesquisa. Vaz (2011) avaliou as condições de cultivo de *E. coli* recombinante para favorecer a expressão do antígeno 503 em incubador rotativo e biorreator de bancada. Sousa Junior *et al.* (2015) estudaram a recuperação e purificação do antígeno 503 de *Leishmania i. chagasi* expresso em *E. coli* e remoção de lipopolissacarídeos (LPS) utilizando adsorção em leite expandido. Leitão (2017) avaliou os métodos de rompimento celular e os diferentes metais imobilizados em resina *Streamline Chelanting* para purificação do antígeno 503.

Nesse contexto, o presente estudo tem como finalidade investigar a estabilidade do plasmídeo pQE-30 e a expressão do antígeno 503 da *Leishmania i. chagasi* usando a *E. coli* M15 além de se avaliar o a influência da concentração do IPTG e da temperatura de cultivo na expressão do antígeno 503.

Este trabalho está dividido em sete capítulos. Este capítulo consiste na introdução, no qual é feita uma abordagem geral do trabalho. Logo em seguida, tem-se o Capítulo 2, onde os objetivos da pesquisa estão expostos. O Capítulo 3 apresenta a revisão bibliográfica, que aborda os aspectos teóricos relacionados ao tema proposto. O Capítulo 4 aborda a metodologia experimental utilizada para realização da pesquisa. O Capítulo 5 apresenta os resultados e discussões. No Capítulo 6 são feitas conclusões finais obtidas através dos resultados deste trabalho. Por fim, no Capítulo 7 são relacionadas todas as referências consultadas e citadas para elaboração deste trabalho.

---

---

## **Capítulo 2**

### **Objetivos**

---

---

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a estabilidade do plasmídeo pQE-30 em *Escherichia coli* M15 e a expressão do antígeno 503 de *Leishmania chagasi* por indução com IPTG.

### 2.2 Objetivos específicos

- Estudar a influência da concentração de IPTG no crescimento celular de *E. coli*, na expressão do antígeno 503 e na formação de ácido acético.
- Analisar o efeito da temperatura de cultivo no crescimento celular e na expressão da proteína de interesse.
- Averiguar a influência das condições de cultivo empregadas sobre os parâmetros de crescimento celular e produção do antígeno 503.
- Avaliar a estabilidade do plasmídeo durante os cultivos realizados.

---

## **Capítulo 3**

### **Revisão Bibliográfica**

---

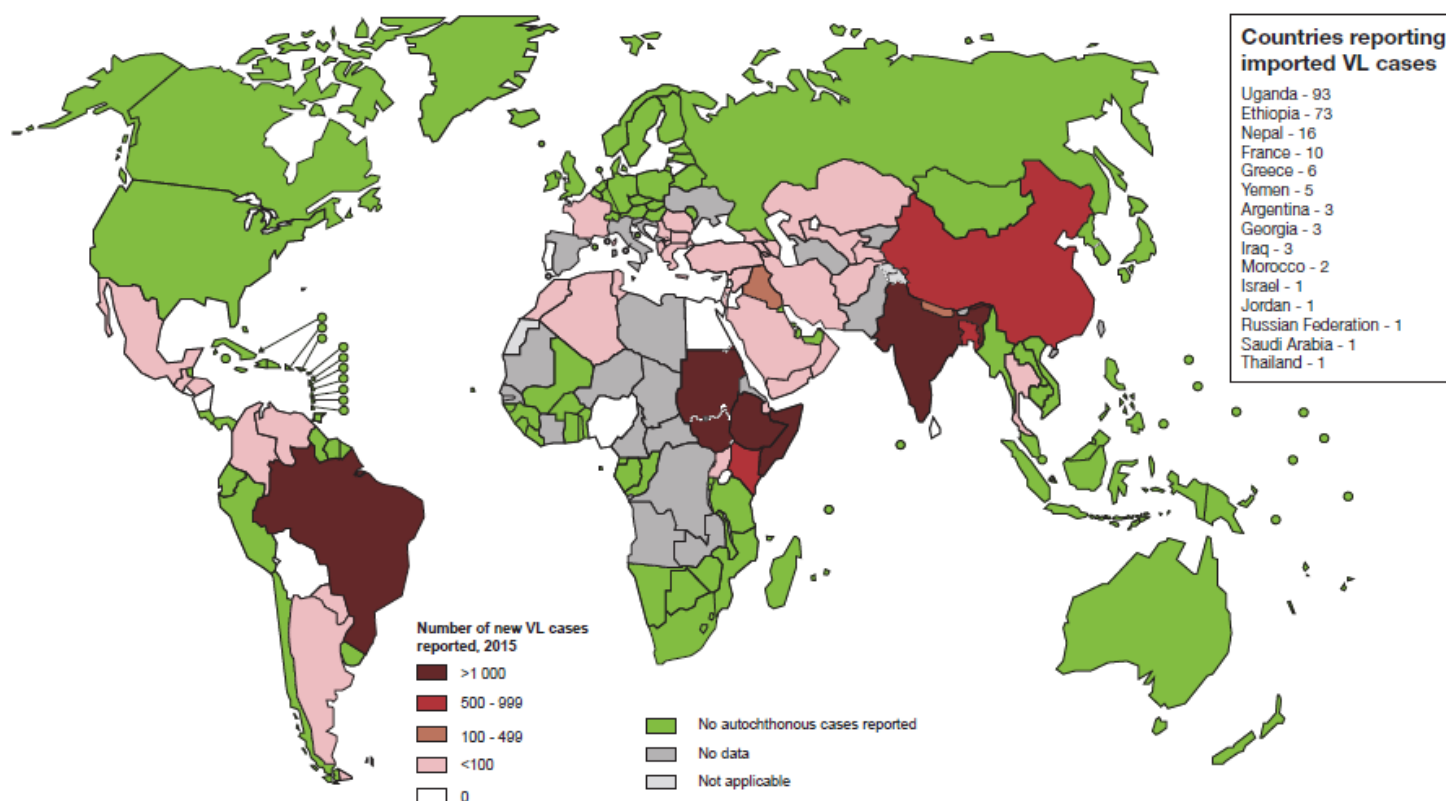
### 3. Revisão Bibliográfica

No presente capítulo faz-se uma revisão da literatura abordando vários conceitos importantes com relação à Leishmaniose, processo de expressão de proteínas recombinantes, estabilidade do plasmídeo, indução com IPTG, purificação de biomoléculas por IMAC, condições de cultivo e formação de ácido acético.

#### 3.1 Leishmaniose visceral

A leishmaniose é uma doença tropical que é causada por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*. Dependendo do tropismo, a doença pode ser caracterizada por, pelo menos, quatro grupos clínicos: cutânea, mucocutânea, cutânea difusa e visceral (Freitas-Junior *et al.*, 2012). A leishmaniose visceral (LV) é a forma mais grave da doença, devido à sua ampla distribuição e elevada letalidade em crianças com desnutrição, idosos e pacientes não tratados (Gontijo & Melo, 2004; Botelho & Natal, 2009; WHO, 2017). A Figura 1 apresenta o estado de endemidade da leishmaniose visceral em todo o mundo no ano de 2015.

Figura 1. Endemidade da leishmaniose visceral em todo o mundo no ano de 2015.



Fonte: World Health Organization, (2017).

### 3.1.1 Situação epidemiológica

Acima de 90% dos casos da doença ocorrem na Índia, Sudão, Bangladesh, Etiópia e Brasil, atingindo, principalmente, as populações pobres desses países. Essa doença está em segundo lugar na mortalidade e em quarto na morbidade entre as ditas doenças tropicais negligenciadas, ocasionando entre 20.000 e 40.000 mortes por ano (Alvar *et al.*, 2012; Hailu, 2016).

A leishmaniose visceral é endêmica nas áreas rurais do Brasil, com mais de 3.500 casos novos todos os anos, ocorrendo em 19 estados do país, sendo a maioria na região Nordeste, que responde por cerca de 70 a 90% da população infectada. As capitais do Nordeste, em sua maioria, localizam-se no litoral, tendo uma alta pluviosidade, clima úmido e temperaturas elevadas, condições que favorecem a proliferação dos insetos flebotomíneos, o que aumenta o risco da população desta região ser infectada (Jerônimo *et al.*, 2004; Ximenes *et al.*, 2007; Selvapandiyan *et al.*, 2012; Cavalcante & Vale, 2014).

### 3.1.2 Agente etiológico e transmissão

Várias espécies de *Leishmania* podem causar a leishmaniose visceral. Os parasitas possuem uma ampla distribuição e pertencem ao complexo *Leishmania donovani*, que incluem as espécies *Leishmania donovani* (encontrada no subcontinente Indiano, Ásia e África), *Leishmania infantum* (no Mediterrâneo) e *Leishmania chagasi* (na América do Sul) (Costa, 2011). Recentes estudos, envolvendo técnicas bioquímicas e moleculares, consideraram que a *L. chagasi* e *L. infantum* são a mesma espécie, portanto este parasita é mencionado como *L. infantum chagasi* ou *L. i. chagasi* (Lima *et al.*, 2012).

A principal forma de transmissão do parasita é através da picada de fêmeas de dípteros da família *Psychodidae*, sub-família *Phlebotominae*, conhecidos genericamente por flebotomíneos (Figura 2), mas são popularmente conhecidos no Brasil como mosquito palha (Galati, 2003). No Brasil, a forma de transmissão é através da picada dos vetores – *L. longipalpis* ou *L. cruzi* – infectados pela *Leishmania chagasi*. Devido ao ambiente favorável do intestino, o parasita se multiplica sendo transmitido durante a próxima picada em um indivíduo saudável. A transmissão pode ser de forma zoonótica, a qual envolve hospedeiros animais no ciclo de transmissão, ou antroponótica, em que o homem é a única fonte de infecção para o vetor (Singh & Sundar, 2012).

Figura 2. Fêmea de Flebotomíneo adulto, engurgitada.



Fonte: Ministério da Saúde, (2006).

### 3.1.3 Quadro clínico

A leishmaniose visceral pode apresentar manifestações clínicas das formas: assintomática, oligossintomática e clássica. As infecções inaparentes ou assintomáticas são aquelas em que não há evidência de manifestações clínicas. O diagnóstico é feito através da coleta de sangue para exames sorológicos ou através da intradermoreação de Montenegro reativa. Em área endêmica, uma pequena proporção de indivíduos, geralmente crianças, pode apresentar um quadro clínico discreto, de curta duração, aproximadamente 15 dias, que frequentemente evolui para cura espontânea (forma oligossintomática). Já a forma clássica da doença é caracterizada por sintomas como febre, anemia, hepatoesplenomegalia, manifestações hemorrágicas, perda de peso, taquicardia, tosse e diarreia (Jerônimo *et al.*, 2004; Costa, 2011).

### 3.1.4 Diagnóstico e tratamento

Por ser uma doença de notificação compulsória e com características clínicas de evolução grave, o diagnóstico deve ser feito de forma precisa e o mais precocemente possível (Botelho & Natal, 2009). A análise clínica é complexa, pois a doença no homem pode exibir sinais e sintomas que aparecem também a outras doenças presentes nas áreas endêmicas onde ela ocorre, como, por exemplo, doença de chagas, esquistossomose, malária e tuberculose. No

Brasil, o teste mais utilizado no diagnóstico de LV humana é o *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA), sendo considerado teste de escolha para inquéritos populacionais (Gontijo & Melo, 2004).

Os principais medicamentos utilizados no tratamento da LV são: antimônias pentavalentes, anfotericina B, anfotericina B lipossomal, miltefosina, paromomicina e pentamidina. Dois compostos antimonias pentavalentes são encontrados no mercado: o estibogluconato de sódio (Pentostan®) e o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®). No entanto, esses fármacos são tóxicos e apresentam custo elevado (Freitas-Junior *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2016). Em caso de resistência aos antimonias, a anfotericina B é utilizada como alternativa no tratamento da LV (Singh & Sundar, 2012).

### 3.2 Antígeno 503

De acordo com o estudo realizado por Martins *et al.* (2006), o antígeno 503, uma proteína com massa de 56 kDa que apresenta 100% de identidade com o fator de alongamento 1- $\gamma$  de *L. infantum*, foi identificado através de dupla varredura em biblioteca de cDNA (DNA complementar) da forma amastigota de *Leishmania i. chagasi*. O antígeno 503 foi testado frente ao soro de indivíduos com LV, e foi observada uma resposta imune celular e humoral, confirmando o potencial da proteína como candidata a vacina ou no desenvolvimento de kits para diagnóstico específico da doença. Foi descrito, ainda, que para uma vacina conferir proteção contra a leishmaniose visceral deve ser capaz de estimular a produção de interferon gama (INF- $\gamma$ ) (Martins *et al.*, 2006).

### 3.3 Engenharia genética e DNA recombinante

A engenharia genética se desenvolveu nos anos 70, quando as enzimas de restrição foram descobertas. Estas enzimas são capazes de reconhecer uma pequena sequência de pares de bases e cortar o DNA neste sítio de reconhecimento ou de corte, da mesma forma que existem outras enzimas que são capazes de ligar dois fragmentos de DNA. Assim o DNA de uma espécie pode ser cortado e ligado ao DNA da mesma ou de outra espécie. Estes procedimentos são conhecidos como tecnologia do DNA recombinante (Guerra & Nodari, 2001). Ela pode ser usada para estudar mecanismos de replicação e expressão gênica, na determinação da sequência de um gene e, consequentemente, da proteína que ele codifica, ou



no desenvolvimento de culturas microbianas capazes de produzir em larga escala substâncias úteis tais como: insulina humana, hormônios, vacinas e enzimas industriais. Sua aplicação comercial ou biotecnológica parece ter um potencial inesgotável (Stryjewska *et al.*, 2013).

Com a tecnologia do DNA recombinante foi possível estudar a estrutura e função das proteínas, principalmente na produção de proteínas recombinantes utilizando sistema procarioto como hospedeiro (Diniz & Ferreira, 2010).

### 3.3.1 Clonagem gênica

O fundamento central da metodologia do DNA recombinante é a clonagem gênica, a qual consiste no isolamento e propagação de moléculas de DNA idênticas. A clonagem gênica compreende pelo menos dois estágios importantes:

- a) Na primeira etapa, o fragmento do DNA de interesse, chamado de inserto, é ligado ao vetor que pode ser uma molécula de DNA chamada de plasmídeo para formar a molécula do DNA recombinante como representado na Figura 3 (Brown, 2003).

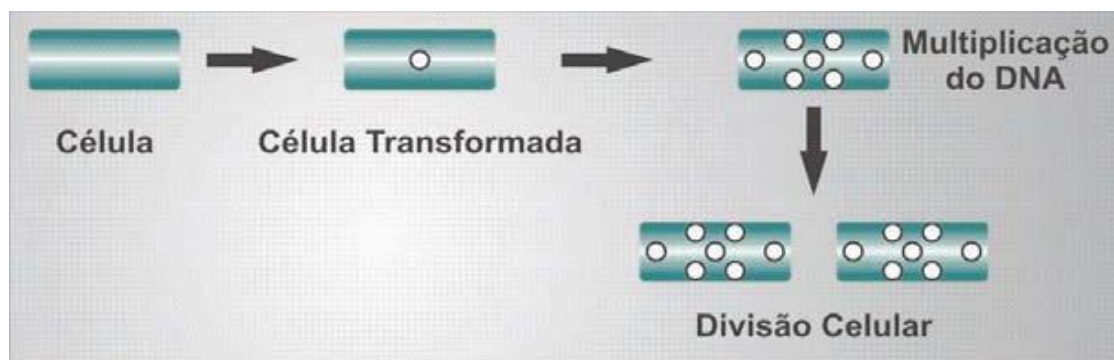
Figura 3. Ligação do vetor com o inserto para formar a molécula de DNA recombinante.



Fonte: Brown, (2003).

- b) Na segunda etapa, a molécula do DNA recombinante é introduzida numa célula hospedeira compatível, num processo chamado de transformação. A célula hospedeira que adquiriu a molécula do DNA recombinante é agora chamada de transformante ou célula transformada, a qual sofre muitos ciclos de divisão, produzindo várias cópias do DNA recombinante, como ilustrado na Figura 4 (Brown, 2003).

Figura 4. Transformação de uma célula com uma construção de DNA recombinante.



Fonte: Brown, (2003).

A origem do termo clonagem vem da genética bacteriana que considera uma colônia de bactérias como um clone, pois todas as células são geneticamente idênticas à bactéria inicial (Linden, 2010).

### 3.4 Estabilidade do plasmídeo

Com o desenvolvimento das técnicas de engenharia genética e da tecnologia do DNA recombinante, cada vez mais microrganismos estão sendo utilizados pela indústria para a produção de proteínas recombinantes, que são produzidas por genes clonados nos vetores de expressão ou plasmídeos, que são elementos genéticos semi-autônomos que se replicam em paralelo ao cromossomo da célula hospedeira (Bingle & Thomas, 2001).

Um dos fatores mais importantes que irão determinar a habilidade da célula recombinante em expressar os seus genes é a capacidade desta de manter os plasmídeos, também conhecida como estabilidade plasmidial. Na produção industrial com microrganismos recombinantes, a maioria dos problemas está na estabilidade do plasmídeo. A instabilidade é a tendência das células recombinantes de perderem algumas propriedades de engenharia molecular por causa de mudanças ou perdas do plasmídeo (Silva *et al.*, 2009). O número de cópias do plasmídeo irá determinar a quantidade de genes disponíveis para a expressão, logo, quanto mais alto o número de cópias, maior produtividade. A instabilidade do plasmídeo provoca a redução dos níveis do produto desejado no cultivo, tendo impacto negativo na expressão de proteínas de interesse e o aumento nos custos de produção, pelo fato de que os substratos serão consumidos por células sem plasmídeo, que não são produtoras de proteína recombinante (Tomazetto *et al.*, 2007).

Existem dois tipos de instabilidade do plasmídeo: a segregacional e a estrutural. A instabilidade de segregação é causada pela perda do plasmídeo durante a divisão celular devido a uma má distribuição dos plasmídeos entre célula mãe e filha na divisão. Na instabilidade estrutural, a perda do plasmídeo é causada por mudanças estruturais do mesmo, devido a deleções, inserções, recombinações ou rearranjos (Popov *et al.*, 2011).

Estudos mostraram que a estabilidade do plasmídeo é afetada por diversos fatores (Tabela 1) como número de cópias do plasmídeo, padrões de replicação, tipo de substrato, composição do meio de cultura, temperatura e características estruturais do plasmídeo (Silva *et al.*, 2009).

Tabela 1 – Fatores que afetam a estabilidade do plasmídeo

<b>Tipo de instabilidade do plasmídeo</b>	<b>Fator</b>	<b>Autores</b>
Estrutural	Tamanho do plasmídeo	Ertl & Thomsen (2003)
	Repetição direta	Hadj <i>et al.</i> (2008)
	Repetição invertida	Bi & Liu (1996)
	Condições de cultura	Oliveira <i>et al.</i> (2009)
Segregacional	Estirpe hospedeira	Xu <i>et al.</i> (2006)
	Multímeros plasmídicos	Summers & Sherratt (1984)
	Falta de pressão seletiva	Goyal <i>et al.</i> (2009)
	Concentração de oxigênio dissolvido	Goyal <i>et al.</i> (2009)
	Baixo pH	Chen <i>et al.</i> (1992)
	Composição do meio de cultivo	O'Kennedy & Patching (1997)
	Estratégia de cultivo	O'Kennedy <i>et al.</i> (2003)

Fonte: Autor

Altas temperaturas tendem a favorecer um rápido crescimento celular, porém, desfavorecer a produção da proteína heteróloga, uma vez que o aumento da temperatura afeta a estabilidade do plasmídeo e consequentemente a expressão da proteína (Zhang *et al.*, 2009a). Portanto, a diminuição da temperatura durante a fase de indução constitui um método simples e eficaz para aumentar a produção da proteína recombinante (Shojaosadati *et al.*, 2008). De acordo com Santos (2012), a retenção do plasmídeo ao final do cultivo diminuiu com o aumento da temperatura. Uma maior degradação do antibiótico em temperaturas mais elevadas pode, também, estar relacionada à menor retenção do plasmídeo observada em temperaturas mais elevadas (Tripathi *et al.*, 2009)

A concentração e o tipo de molécula indutora também influenciam consideravelmente a estabilidade do plasmídeo e consequente expressão da proteína recombinante. A carga

metabólica imposta pela expressão da proteína de interesse à célula hospedeira resulta na instabilidade do plasmídeo (Einsfeldt *et al.*, 2011). De acordo com Einsfeldt *et al.* (2011), altas concentrações de IPTG tiveram uma influência negativa no crescimento celular e na estabilidade do plasmídeo durante a produção da proteína ClpP expressa em *E. coli*.

O pH do cultivo pode interferir na estabilidade dependendo da cepa e do plasmídeo utilizado. A velocidade de crescimento específico e a manutenção plasmidial são controladas pelas mesmas reações intracelulares. A estabilidade do plasmídeo nas células hospedeiras é dependente, principalmente, do sistema replicante e dos mecanismos de regulação e um dos passos destes mecanismos são afetados pelo pH (Bhaduri, 2011). Tomazetto *et al.* (2007) relataram que a acidificação do meio de cultura causou interferência na produção de jaburetox-2Ec e na instabilidade do plasmídeo pET101/jaburetox-2Ec.

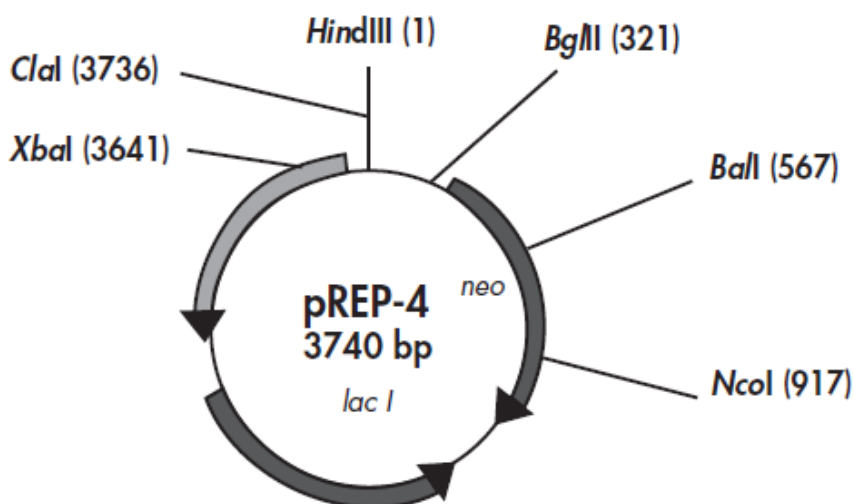
Na tentativa de aumentar a estabilidade do plasmídeo, é realizada a pressão seletiva através da incorporação de antibióticos no meio de cultivo. A inserção de genes que conferem resistência ao antibiótico no plasmídeo, seguido da adição do antibiótico correspondente ao meio de cultivo, permite a pressão seletiva das células com plasmídeo. Os antibióticos mais utilizados são ampicilina e canamicina, em que os plasmídeos resistentes à canamicina são mais estáveis que os plasmídeos resistentes à ampicilina. Sendo assim, um método simples, de baixo custo e reprodutível (Silva *et al.*, 2012).

O plasmídeo pQE-30 tem o tamanho de 3400 pares de base, pertence à família de plasmídeos pDS, foi derivado de plasmídeos pDS56/RBSII e pDS781/RBSII-DHFRS e possui as seguintes características:

- Elemento promotor-operador otimizado constituído pelo promotor de fago T5 (reconhecido pela polimerase de RNA de *E. coli*) e duas sequências de *operon lac* que aumentam a ligação do repressor *lac* e asseguram uma repressão eficiente do promotor T5;
- Possui uma cauda (“tag”) com seis resíduos de histidina em fusão na porção N-terminal;
- Origem de replicação no plasmídeo ColE1;
- Possui o gene para a  $\beta$ -lactamase (*bla*) que confere resistência à ampicilina a 100  $\mu\text{g/ml}$  em *E. coli* (THE QIA EXPRESSIONIST, 2003).

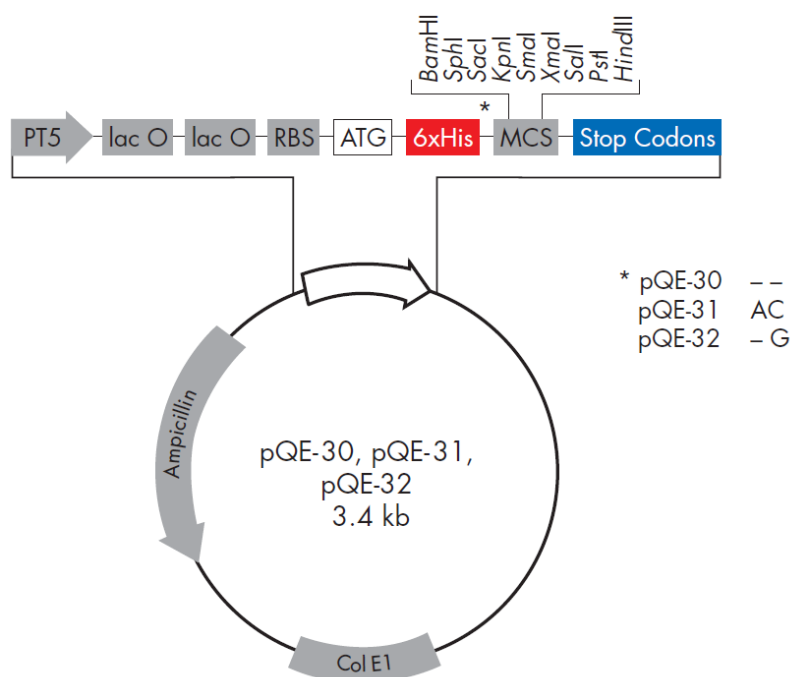
A cepa de *E. coli* M15 utilizada como hospedeira para o plasmídeo pQE-30, possui o plasmídeo pREP4 (Figura 5) que tem tamanho de 3740 pares de base e possui gene para a fosfotransferase 3-aminoglicosídeo (neo) que confere resistência à canamicina a 25 µg/ml. A Figura 6 ilustra o plasmídeo pQE-30.

Figura 5. Ilustração do plasmídeo pREP4.



Fonte: The QIA Expressionist, (2003).

Figura 6. Ilustração do plasmídeo pQE-30.



Fonte: The QIA Expressionist, (2003).

### 3.5 Indução e expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*

A bactéria *Escherichia coli* faz parte da microbiota gastrointestinal do organismo animal, porém cepas patogênicas da espécie podem causar uma série de doenças intestinais e extra-intestinais em homens e animais (Alberts, 2011). *E. coli* é o hospedeiro mais utilizado e estudado para a produção de proteínas heterólogas, desde o advento da tecnologia do DNA recombinante (Tian *et al.*, 2011). Embora exista uma gama de organismos que são utilizados como hospedeiros, essa bactéria gram-negativa é a opção mais atraente devido à facilidade de manipulação, baixo custo referente ao seu crescimento e facilidade na ampliação para escala industrial das moléculas produzidas por essa bactéria (Cui *et al.*, 2016). Algumas desvantagens no uso dessa bactéria como sistema de expressão incluem a incapacidade da *E. coli* em realizar as modificações pós-tradução que ocorrem em eucariotos, a ausência de um mecanismo para a secreção da proteína alvo para o meio de cultura e a limitada capacidade de produzir proteínas contendo múltiplas pontes dissulfeto (Balbas, 2001; Tomazetto *et al.*, 2007; Sahdev *et al.*, 2008). Apesar do grande conhecimento sobre *E. coli*, isto não é o suficiente para garantir um eficiente sistema de expressão para todas as proteínas recombinantes, já que cada uma delas pode apresentar diferentes problemas, como por exemplo a degradação da proteína recombinante por proteases produzidas pela *E. coli*. Esses problemas devem ser otimizados com constantes ajustes nas metodologias através de variações empíricas que são baseadas na tentativa-erro (Bustamante Filho, 2010).

A indução é o fenômeno pelo qual a transcrição de genes estruturais de um operon aumenta em resposta a presença de um substrato específico no meio. Isso se deve pelo fato da síntese de uma proteína requerer grandes quantidades de recursos e energia, tornando inviável para a célula a expressão de todos os genes presentes em seu DNA (Rozendo *et al.*, 2014).

Na regulação gênica em *E. coli*, um gene induzível é aquele cuja transcrição é ativada pela adição de um indutor ao meio. Os indutores unem-se a sítios específicos que podem estar localizados nas proximidades ao promotor, resultando no favorecimento da transcrição pelo aumento da afinidade da RNA-polimerase, dessa forma, tal composto químico também apresenta a capacidade de regular a expressão do gene. Podendo ser uma vantagem para a produção de proteínas recombinantes, uma vez que é possível o controle de sua síntese (Zaha *et al.*, 2014).

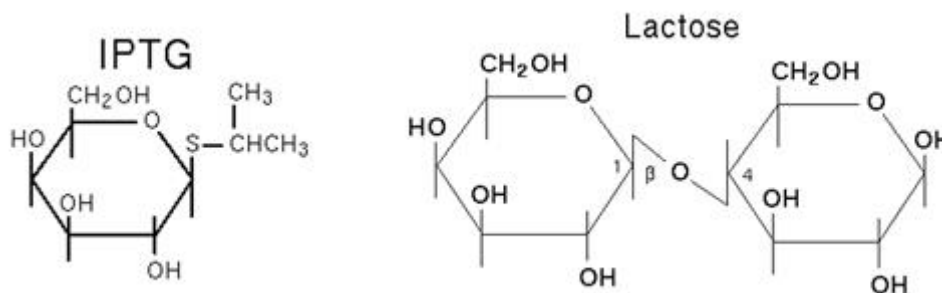
Diversos parâmetros influenciam no rendimento final da proteína recombinante como, por exemplo, a composição do meio de cultivo, temperatura de cultivo, a taxa de crescimento

específico no instante de indução, o tipo de molécula indutora, podendo ser lactose ou IPTG. Dentre esses parâmetros, o tipo de indutor exerce efeito significativo na expressão de proteínas recombinantes (Pilarek *et al.*, 2011). Esses indutores têm um alto impacto nos custos do processo, podendo influenciar negativamente no crescimento celular, devido a efeitos tóxicos para as células hospedeiras (Einsfeldt *et al.*, 2011).

A indução térmica é baseada na troca de temperatura para que ocorra o início da transcrição da proteína de interesse. Ela tem sido utilizada com sucesso na produção de proteínas recombinantes e peptídeos, já que se baseia em um promotor forte e regulável e o uso de indutores químicos tóxicos e caros é evitado (Tomazetto *et al.*, 2007; Valdez-Cruz *et al.*, 2010). Além disso, os riscos de manipulação da cultura e de contaminação são minimizados, uma vez que a temperatura nos fermentadores pode ser prontamente modificada por meios externos. O sistema pode ter ampliação de escala fácil, embora as limitações de transferência de calor de biorreatores em larga escala devem ser levadas em consideração, pois a taxa de aquecimento diminuirá à medida que o volume de cultura aumentar (Caspeta *et al.*, 2009). A expressão baseada no controle pelo promotor  $\lambda P_L$ , regulado pelo repressor termossensível, é uma das mais usadas para produção de proteínas em larga escala utilizando *E. coli*. O promotor  $\lambda P_L$  é ativado quando a temperatura de cultivo aumenta de 30 para 42 °C, liberando a ação do promotor, o que habilita o início do processo de transcrição/tradução da proteína recombinante. Similar ao que ocorre com outros sistemas de expressão, a produção de proteínas heterólogas causa importante estresse e desequilíbrio metabólico. A alta expressão de uma proteína recombinante pode desencadear uma vigorosa resposta similar ao choque térmico (*heat shock response*) e a resposta SOS, uma resposta global caracterizada pelo dano ao DNA, como a parada do ciclo celular, do reparo do DNA e a indução de mutagênese, resultando em uma carga metabólica para as células. Como consequência, a taxa específica do crescimento cai e pode ocorrer degradação do ribossomo e alterações no metabolismo do carbono (Perez, 2015).

A descoberta de promotores e repressores específicos do genoma de *E. coli* e de diversas células eucarióticas permitiu a manipulação da expressão de proteínas e a clonagem de genes sob o controle de um dado promotor, cuja expressão pode ser induzível ou contínua. O *operon lac* tem sido amplamente estudado e utilizado em sistemas de expressão de proteínas recombinantes com *E. coli* como hospedeira. O indutor natural do *operon lac* é a lactose, que vem sendo substituída por outros indutores, sendo o IPTG (Figura 7) o mais utilizado (Ettinger *et al.*, 2009; Marbach & Bettenbrock, 2012).

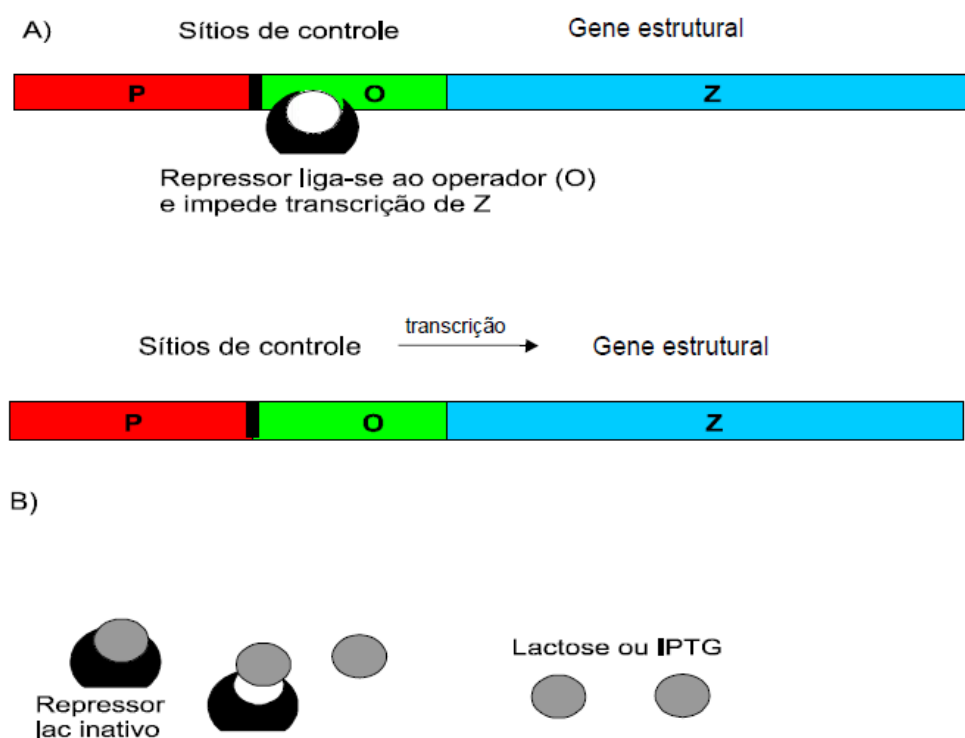
Figura 7. Ilustração das estruturas de IPTG e lactose, respectivamente.



Fonte: MIT, (2010).

Neste sistema, o DNA de interesse é clonado em fago ou plasmídeo contendo o *lacI* (repressor), *lacP*, (promotor), *lacZ* (gene estrutural transcrito para mRNA da β-galactosidase). A indução da transcrição é obtida pela adição de um análogo de lactose sintético e não degradável, o IPTG, o qual se associa ao repressor e o inibe, deixando o promotor livre para a interação com o RNA polimerase e consequente transcrição do gene (Chaves, 2009). O funcionamento do *operon lac* está representado na Figura 8:

Figura 8. Esquema com a ilustração do funcionamento do *operon lac*. A) Na ausência de indutor. B) Na presença de indutor.



Fonte: Chaves, (2009).



O IPTG representa hoje um dos indutores mais utilizados em sistemas de alta expressão, no entanto uma das grandes dificuldades na indução por IPTG é a sua alta toxicidade, apresentando efeitos negativos no crescimento celular, que pode inviabilizar a produção de uma proteína de interesse em larga escala. A descoberta de novos indutores, menos tóxicos e com a mesma eficácia de indução do IPTG poderia, portanto, ser de grande utilidade quanto à produção quantitativa de uma determinada proteína (Wandrey *et al.*, 2016).

A forma de indução por IPTG empregada varia tanto em concentrações do indutor, fase da indução, temperatura e tempo de indução. Sendo que essas condições devem ser testadas e otimizadas, pois dependerão da proteína a ser produzida, da estirpe de *E. coli*, do meio de cultivo, entre outros fatores que são específicos de cada processo (Papaneophytou & Kontopidis, 2014).

Na indução química com IPTG, podem ser necessárias operações adicionais para remover esse indutor químico, uma vez que proteínas destinadas ao uso farmacêutico necessitam de alta qualidade e pureza, complicando o bioprocesso e aumentando seu custo. Estes problemas podem contornados através da utilização da lactose como indutor ou fazendo a utilização de variantes termossensíveis do repressor *lacI*, que permitem a indução térmica da síntese de proteínas recombinantes (Valdez-Cruz *et al.*, 2010).

Uma alternativa ao IPTG é a própria lactose, já que apresenta um baixo custo e não é tóxica para as células, além de funcionar como fonte de carbono. Porém, apresenta a desvantagem de depender da presença de permeases na superfície das bactérias, de ser pouco solúvel em água, devido as grandes quantidades necessárias para a indução, e de ser consumida durante o cultivo (Zhang *et al.*, 2009b). Kilikian *et al.* (2000) mostraram que a produção da proteína Troponina C (TnC) com o IPTG foi 12% maior se comparado com a obtida com lactose.

A temperatura ótima de crescimento da *E. coli*, de 37 a 39°C, coincide com a temperatura ótima de indução do *operon lac*. O uso de temperaturas menores reduz as alterações metabólicas indesejáveis, como a síntese de proteases, aumentando, dessa forma, o rendimento do produto de interesse e, ainda, contribuindo para a aumentar a solubilidade da proteína, isto é, reduzindo a formação de corpos de inclusão. A redução da temperatura melhora ainda a capacidade de excreção da proteína, contribuindo para a conformação adequada e redução da etapa de rompimento celular (Vaz, 2011).

As condições mais utilizadas para expressão de proteínas recombinantes utilizam uma concentração de 1,0 mM de IPTG à uma temperatura de 37°C (Vaz *et al.*, 2011). No entanto,

tem sido observado que a utilização de menores concentrações de IPTG é capaz de induzir a síntese sem causar impacto negativo na produção da proteína recombinante (Olaofe *et al.*, 2010; Einsfeldt *et al.*, 2011; Larentis *et al.*, 2014). Quanto menor a concentração de indutor utilizada para se obter alta expressão da proteína recombinante, mais barato será o processo de produção.

Muitas proteínas são produzidas na forma insolúvel, biologicamente inativadas na forma de corpos de inclusão. A formação dos corpos de inclusão é atribuída à superexpressão de proteínas na célula sem os acessórios necessários para o seu dobramento para a forma nativa, ela não tem correlação com as propriedades intrínsecas, como massa molar e hidrofobicidade (Patra *et al.*, 2000). A atividade biológica da proteína pode ser reconstituída através de processos complexos de renaturação que implicam no aumento de custos e na diminuição da produtividade (Singh & Panda, 2005).

### 3.6 Condições de cultivo e formação de ácido acético

Cultivos microbianos em altas densidades celulares são requeridos para incrementar as produções de biomassa e da proteína recombinante, sendo alguns dos pré-requisitos para uma alta produtividade. Técnicas para o cultivo de *E. coli* a altas densidades celulares vêm sendo desenvolvidas, tendo como vantagens: redução do volume de cultura, redução no investimento em equipamentos, melhorar o processo de recuperação de proteínas, reduzir custos de produção e aumento do valor do produto (Tomazetto *et al.*, 2007). No entanto, apesar da eficiência elevada na produção de diferentes proteínas recombinantes, a cultura de alta densidade celular apresenta vários problemas, como: a limitação na capacidade de transferência de oxigênio, acúmulo de gás carbônico o qual pode diminuir a velocidade de crescimento e estimular a formação de metabólitos inibidores, redução na eficiência da homogeneização do meio de cultivo e na dissipação de calor (Vaz *et al.*, 2015).

Uma variável importante que é utilizada no controle do metabolismo celular é a temperatura de cultivo. A temperatura ótima de crescimento da *E. coli* é de 37°C, com a diminuição deste valor, reduz-se a capacidade de consumo de nutrientes, bem como a taxa específica de crescimento, minimizando os efeitos tóxicos dos produtos metabólicos secundários, a geração de calor pelo metabolismo e a demanda de oxigênio. Além disso, ao operar-se o cultivo a temperaturas mais baixas evita-se a formação de corpos de inclusão antes de obter-se a concentração celular desejada (Noor *et al.*, 2013).

A frequência de rotação durante a agitação ou velocidade de agitação é outra variável importante em todo processo aeróbio, apresentando um efeito significativo, principalmente, na síntese do produto de interesse e na produção de ácido acético. De acordo com Vaz (2011) que utilizou a *E. coli* recombinante para produção de antígeno 503, as frequências de 200, 400 e 600 rpm estudadas, por atingirem concentrações de ácido acético inferiores a 0,9 g/L, não exerceram efeito inibitório no crescimento e na expressão da proteína.

A elevada agitação tende a aumentar a troca metabólica da célula com o meio de cultivo obtendo energia suficiente para a bactéria exercer suas atividades metabólicas não desviando seu metabolismo para a formação de ácido acético. A limitação de oxigênio no meio pode causar o desvio do metabolismo da bactéria de aeróbio para anaeróbio (Xue *et al.*, 2010).

Vale a pena destacar que em um cultivo envolvendo células recombinantes, a concentração de ácido acético produzido tem papel fundamental sobre o desempenho do processo, uma vez que este metabólito inibe tanto crescimento celular quanto a expressão da proteína heteróloga. Os danos ocorridos à célula devido à presença do ácido acético são causados pela redução do pH interno celular. A maior quantidade de ácido acético é produzida quando o fluxo de carbono para o caminho metabólico central excede a demanda biossintética e a capacidade de geração de energia da célula, saturando o ciclo tricarboxílico (ciclo de Krebs) e/ou a cadeia de transporte de elétrons (Lecina *et al.*, 2013).

A formação de ácido acético, em geral, depende do meio de cultura utilizado e da taxa específica de crescimento. Alterações na composição do meio de cultura, principalmente na fonte de carbono utilizada para o cultivo, podem influenciar na minimização da formação de ácido acético. Em culturas para obtenção de altas densidades celulares, como a batelada alimentada, a produção do inibidor é maior que em processos em batelada devido ao maior tempo de cultivo. Uma das maneiras mais eficientes para minimizar sua produção é limitar os nutrientes necessários ao crescimento celular, como a fonte de carbono ou nitrogênio (Lima, 2004).

Os meios de cultivos para *E. coli* normalmente apresentam glicose como fonte de carbono, porém a rápida assimilação da glicose acarreta, também, em uma intensa formação de ácido acético, causando inibição do crescimento e da produção da proteína recombinante. Além disso, a produção do mesmo é favorecida quando um meio complexo é utilizado ao invés de um meio definido. Uma maior concentração de extrato de levedura acarreta na maior concentração de subprodutos no meio de cultivo, como o ácido acético, por exemplo (Suárez *et al.*, 1998).

Estudos realizados por Xue *et al.* (2010), mostram que concentrações de ácido acético entre 0,9 e 1,5 g/L são inibitórias para o crescimento celular e para expressão de proteínas recombinantes. O nível de produção de ácido acético e os valores de acetato que irão inibir, parcialmente ou totalmente o crescimento, depende da cepa de *E. coli* utilizada. O efeito prejudicial do ácido acético pode ser exacerbado pelo acúmulo de sais resultantes da adição de ácido e bases utilizados para o controle do pH (Carvalho *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014). Ademais, o ácido acético tem um efeito nocivo maior em culturas recombinantes do que em culturas não recombinantes (Tian *et al.*, 2011; Vaz, 2011).

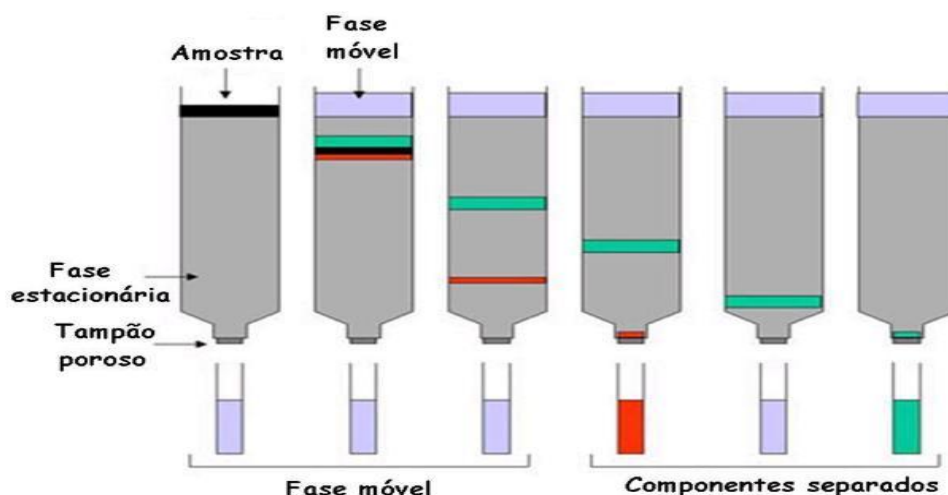
Com a redução da velocidade de crescimento e o rendimento em biomassa, consequentemente, há uma redução na produção da proteína recombinante desejada. Desta forma, a composição do meio, a fonte de carbono empregada, a temperatura de cultivo, inovações na estratégia de alimentação, além de mudanças genéticas, vêm sendo estudadas com o objetivo de limitar o acúmulo de ácido acético durante os cultivos de *E. coli* e de maximizar o rendimento da proteína recombinante (Lecina *et al.*, 2013).

### 3.7 Recuperação e purificação de biomoléculas recombinantes

As etapas de recuperação e purificação de biomoléculas, também conhecida como “downstream processing”, é fundamental na obtenção de amostras adequadas para o estudo estrutural. A purificação de uma proteína envolve o seu isolamento a partir da fonte, sendo baseado em suas diferentes características físico-químicas. O objetivo é a retenção da maior quantidade de proteínas funcionais com o menor número de contaminantes. Destaca-se que os custos com a etapa de purificação de uma proteína recombinante podem chegar a até 80% do custo total do processo (Assenberg *et al.*, 2013).

Uma das técnicas mais utilizadas na recuperação e purificação de proteínas é a cromatografia, pelo fato de ter um baixo custo e fornecer informações qualitativa e quantitativa. As proteínas são capazes de adsorver em uma grande variedade de fases sólidas de forma seletiva. Logo, as técnicas de adsorção realizadas em colunas cromatográficas têm se tornado uma opção bastante utilizada nos processos de purificação de proteínas (Zhao *et al.*, 2009). A configuração física geral é de uma fase estacionária empacotada em uma coluna, através da qual a fase móvel é bombeada. Os solutos da fase móvel, por exemplo, as proteínas são adsorvidas ou retidas no meio poroso, para posterior remoção por ação de um eluente, resultando na separação das diferentes moléculas (Figura 9).

Figura 9. Ilustração de um esquema simplificado de uma coluna cromatográfica.



Fonte: Chaves, (2009).

### 3.7.1 Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC)

A técnica de cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) baseia-se na afinidade diferencial que íons metálicos imobilizados em uma matriz sólida apresentam por certos grupamentos expostos na superfície de uma molécula em solução. Essa afinidade resulta de ligações de coordenação reversíveis formadas entre um íon metálico quelatado e certos resíduos de aminoácidos, como imidazol da histidina, que doam elétrons para o íon metálico, atuando como base de Lewis (Bresolin *et al.*, 2009).

As proteínas presentes na fase móvel são adsorvidas, principalmente, pela formação de ligações de coordenação com sítios remanescentes dos íons metálicos quelatados. Após uma etapa de lavagem, as proteínas que ficam ligadas, por afinidade, ao metal imobilizado na fase estacionária, também chamada de matriz, são eluídas através da passagem de solução com competidor pelo sítio ativo, podendo ser utilizado imidazol, solução salina ou EDTA. Estes irão atuar deslocando a proteína do sítio ativo por terem mais afinidade pelo metal (Bornhorst & Falke, 2000). Além disso, a eluição da proteína pode ser realizada por protonação de grupos doadores de elétrons presentes na proteína adsorvida, ao reduzir-se o pH da solução tampão (Bresolin *et al.*, 2009).

A IMAC tem sido uma técnica muito utilizada para a purificação de proteínas devido ao seu baixo custo, à especificidade, alta capacidade de adsorção e por apresentar condições

brandas de eluição da proteína adsorvida. O adsorvente na IMAC é de fácil regeneração e não apresenta degradação química ou microbiológica durante a estocagem. Além dessas vantagens, os adsorventes na IMAC são muito versáteis, pois diferentes íons metálicos podem ser imobilizados usando o mesmo adsorvente, após a regeneração do mesmo com EDTA, podendo ser utilizados em mais de 100 ciclos, fato este que os tornam importantes sob o ponto de vista de aplicação industrial (Bresolin *et al.*, 2009; Barazzone *et al.*, 2011).

O antígeno 503 apresenta uma cauda (“tag”) de seis resíduos de histidina em fusão, o que permite a purificação das proteínas em colunas quelantes de  $\text{Ni}^{2+}$ . Os aminoácidos da cauda de histidina, presentes na proteína recombinante, possuem afinidade com íons de níquel da resina, permitindo assim, a ligação entre a proteína e a resina. As proteínas que não apresentam a cauda de histidina são removidas nos processos de lavagens e as que possuem cauda são eluídas da resina pelo imidazol.

---

---

## **Capítulo 4**

### **Material e métodos**

---

---

## 4. Material e métodos

*Neste capítulo, são apresentadas as principais metodologias, bem como os reagentes, materiais e equipamentos utilizados durante os experimentos realizados deste trabalho.*

### 4.1 Microrganismo

No presente estudo, a cepa de *Escherichia coli* M15 que contém o plasmídeo pQE-30 (Qiagen, Valencia, CA) foi utilizada para expressão do antígeno 503 de *Leishmania i. chagasi*, apresentando uma cauda (“tag”) de seis resíduos de histidina em sua terminação.

A cepa *Escherichia coli* M15 contendo o antígeno 503 foi gentilmente cedida pela Dra. Mary Wilson (University of Iowa, U.S.A.). De acordo com a literatura, a massa molecular do antígeno 503 é de 56 kDa (Martins *et al.*, 2006). A cepa foi armazenada a -80 °C em microtubos com glicerol a 50% no Laboratório de Imunogenética do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

### 4.2 Meio de cultivo

O meio de cultivo utilizado é o 2xTY cuja composição é descrita na Tabela 2 (Vaz *et al.*, 2015). O meio foi preparado utilizando água destilada, teve o pH ajustado para 7,0, e em seguida foi esterilizado em autoclave a 120 °C, durante 20 minutos. Antes do início do cultivo, o meio foi suplementado com antibióticos (Item 4.2.1),

Tabela 2 – Composição do meio de cultivo 2xTY.

Nutriente	Composição (g/L)
Triptona	16,0
Extrato de Levedura	10,0
NaCl	5,0

#### 4.2.1 Antibióticos

As soluções de antibióticos utilizadas foram preparadas com água deionizada e esterilizadas por filtração em membrana de 0,22 µm. Após a esterilização, as soluções foram



armazenadas a -20 °C. Os antibióticos utilizados foram a ampicilina e canamicina com concentrações de 100 mg/mL e 25 mg/mL, respectivamente.

### 4.3 Preparo do inóculo

Para ativação do microrganismo, 200 µL da solução de glicerol, onde se encontrava a cepa de *Escherichia coli* armazenada a -80 °C que continha o antígeno 503, foram transferidos assepticamente para 50 mL do meio 2xTY. O meio foi previamente esterilizado e, posteriormente, suplementado com 50 µL de ampicilina (0,1 g/L) e 50 µL de canamicina (0,025 g/L) em frascos Erlenmeyer de 250 mL. Esse cultivo inicial foi realizado em incubador rotativo (TE-421, Tecnal, Brasil) a uma temperatura de 37 °C e 200 rpm, por 12 horas e chamado de pré-inóculo. Para preparo do inóculo, foram adicionados 5,0 mL do pré-inóculo a 45,0 mL do meio de cultivo 2xTY, contidos em Erlenmeyers de 250 mL e foram incubados a 200 rpm e 37 °C por 6 horas. Esta suspensão constitui o inóculo dos ensaios realizados em incubador rotativo (Vaz, 2011).

### 4.4 Cultivo em incubador rotativo

Nos ensaios em incubador rotativo, 45,0 mL do meio de cultivo 2xTY foram adicionados com 5,0 mL do inóculo (Conforme obtido no Item 4.3) em Erlenmeyer de 250 mL, e incubados a 200 rpm e 37 °C por 12 horas. Amostras foram coletadas em intervalos regulares (cada 2 horas) e, em seguida, submetidas às análises de pH, estabilidade do plasmídeo, concentração celular, proteína total, eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e ácido acético.

### 4.5 Avaliação da concentração de IPTG em incubador rotativo

Para avaliar o efeito da indução por IPTG sobre o crescimento celular de *E. coli*, expressão do antígeno 503 e sobre a estabilidade do plasmídeo pQE-30, os cultivos foram induzidos pela adição de diferentes concentrações de IPTG (Tabela 3) no início da fase exponencial de crescimento no tempo fixo de 30 minutos, quando a densidade óptica (OD<sub>600 nm</sub>) esteve entre 0,5 e 0,7. A temperatura de indução foi de 37 °C. Amostras serão coletadas a cada duas horas do incubador rotativo no período de 12 horas. Todos os cultivos foram realizados em duplicata.

Tabela 3 – Cultivos que foram realizados para estudo cinético.

Cultivo	Concentração de IPTG (mM)	Temperatura de cultivo (°C)
A	0,01	37
B	0,10	37
C	0,50	37
D	1,00	37
E	1,50	37
F	1,00	27
G	1,00	32
H	1,00	42

#### 4.6 Avaliação da temperatura de indução em incubador rotativo

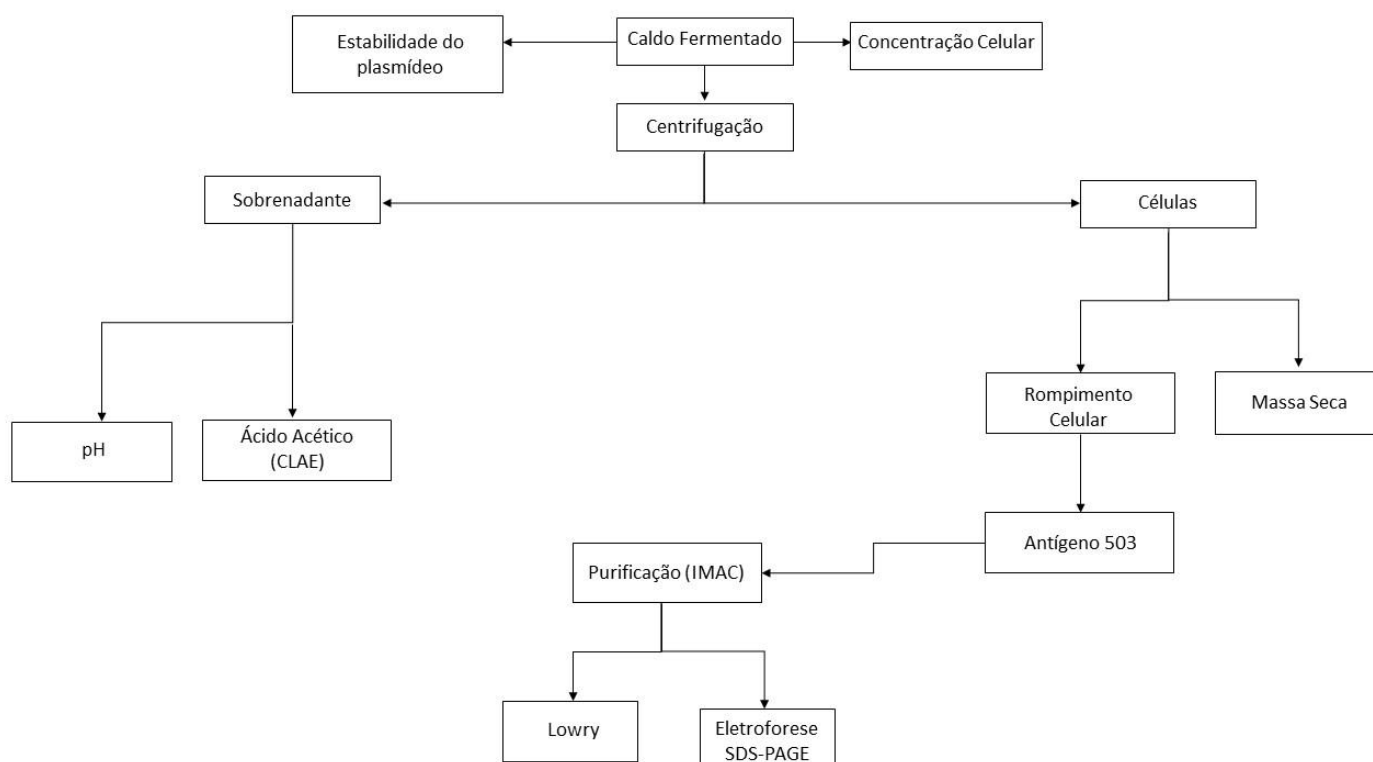
Para estudar o efeito da temperatura de cultivo sobre o crescimento celular de *E. coli*, expressão do antígeno 503 e sobre a estabilidade do plasmídeo, os cultivos foram realizados em diferentes temperaturas (Tabela 3), em que a concentração de IPTG utilizada foi aquela que apresentou os melhores resultados na produção do antígeno 503 (Seção 4.5). Todos os cultivos foram realizados em duplicata.

#### 4.7 Métodos analíticos

Durantes os cultivos em incubador rotativo, uma alíquota foi retirada a cada duas horas a fim de serem realizadas as análises de determinação de pH, estabilidade do plasmídeo, concentração celular, proteína total e ácido acético. A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi utilizada para avaliar a expressão da proteína de interesse.

A Figura 10 ilustra um fluxograma das etapas e métodos usados no presente estudos nos ensaios realizados em incubador rotativo.

Figura 10. Fluxograma ilustrando etapas e métodos analíticos.



#### 4.7.1 Determinação da estabilidade do plasmídeo

Em todos os ensaios realizados a estabilidade do plasmídeo foi avaliada a cada 2 h de cultivo, seguindo a metodologia previamente descrita por Tomazetto *et al.* (2007). Inicialmente foi realizada uma diluição seriada, com a amostra da suspensão celular retirada do incubador rotativo, em solução salina (NaCl 0,85%) nas ordens de  $10^5$  a  $10^7$ , e 100,0  $\mu$ L de cada diluição foi semeada em placas contendo LB/ágar (Tabela 4) suplementado com os antibióticos ampicilina (0,1 g/L) e canamicina (0,025 g/L), e em placas contendo LB/ágar sem antibiótico (controle). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas em estufa bacteriológica (TE-392/1, Tecnal, Brasil). Os testes foram realizados em triplicata e a estabilidade do plasmídeo foi expressa em percentual de células com plasmídeo. Para isso, foi determinada a razão entre a contagem de colônias na placa de LB/ágar com antibióticos (apenas células com plasmídeo) e a contagem de colônias na placa de LB/ágar sem antibiótico (total de células presentes) (Deane & Rawlings, 2004; Vidal *et al.*, 2005; Einsfeldt *et al.*, 2011).

Tabela 4 – Composição do meio de cultivo LB/Ágar.

Nutriente	Composição (g/L)
Tryptona	10,0
Extrato de Levedura	5,0
NaCl	10,0
Ágar Bacteriológico	15,0

#### 4.7.2 Concentração celular

O monitoramento do crescimento celular no cultivo foi realizado através da leitura de absorbância (densidade óptica) a 600 nm em espectrofotômetro (Genesys 10 uv, Thermo Spectronic, EUA). O procedimento consiste na diluição de uma alíquota da suspensão contendo as células dos microrganismos em meio de cultivo sem inóculo e realização da leitura da absorbância contra um branco com o caldo de fermentação na mesma diluição. Para se correlacionar a absorbância com a massa seca celular, foi construída uma curva de calibração através da determinação do peso seco das células.

#### 4.7.3 Determinação do pH

O acompanhamento do potencial Hidrogeniônico (pH) foi realizado ao longo de todo o cultivo em incubador rotativo utilizando-se o potenciômetro de bancada (S20 SevenEasy, Mettler Toledo, EUA).

#### 4.7.4 Rompimento celular

Para o rompimento celular foi utilizado um tampão de rompimento celular a base de ureia cuja composição consiste de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (100,0 mM), ureia (8,0 M) e Tris-Cl (10,0 mM) com o pH ajustado para 8,0. Primeiramente, as células foram armazenadas em banho de gelo por 15 minutos; em seguida, ressuspensas em tampão de rompimento a base de ureia e homogeneizadas por 15 minutos em agitador de tubos tipo vórtex (AP56, Phoenix, Brasil) a temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Para remover os resíduos, foi realizada a centrifugação a 2800 rpm por 30 minutos em microcentrífuga (5415D, Hamburgo, Alemanha). A proteína de

interesse presente no sobrenadante foi transferida para microtubos tipo Eppendorf e analisadas posteriormente (Leitão, 2017).

#### 4.7.5 Determinação da concentração de ácido acético

A produção do metabólito ácido acético foi quantificada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utilizando o cromatógrafo modelo Acella (Thermo Scientific, EUA). As alíquotas do caldo fermentado foram centrifugadas a 2800 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi filtrado com membrana 0,22 µm antes de ser analisado por CLAE. As análises do ácido acético foram conduzidas utilizando a coluna Shim-Pack SCR-101H (Shimadzu Co., Japão) com detector de índice de refração – IR a uma temperatura de 65°C. A solução de ácido sulfúrico 0,005 M foi utilizada como fase móvel sob fluxo de 1,0 mL/min. O volume de injeção na coluna foi de 20,0 µL. O ácido acético foi quantificado utilizando uma curva padrão na faixa de concentração de 0,1 – 1,2 g/L de acordo com Lu *et al.* (2009).

#### 4.7.6 Purificação por Cromatografia de Afinidade por Metal Imobilizado (IMAC)

A purificação das proteínas foi realizada por cromatografia de afinidade por metal imobilizado (IMAC) (Qiagen, Valencia, CA) utilizando a resina Níquel Sepharose Fast Flow (GE Healthcare, Suécia) e uma coluna de leito fixo com volume de 25,0 mL. Assim, 0,5 mL de 50% em volume da resina equilibrada com o tampão de lavagem foram adicionados aos tubos de ensaio contendo 2,0 mL da amostra após rompimento celular (Seção 4.7.4). Antes de adicionar a coluna, os tubos foram agitados a 200 rpm por 30 minutos a  $25 \pm 2$  °C em incubador rotativo. Então, para cada tubo, o conteúdo foi vertido na coluna e a bomba acionada. Em seguida, a resina foi lavada por duas rodadas com 4,0 mL do tampão de lavagem e eluída duas vezes com 1,0 mL do tampão de eluição (Tabela 5). As frações eluídas foram coletadas para posterior análise (Vaz, 2011).

**Tabela 5** – Composição dos tampões para lise e purificação.

Componente	Tampão		
	Rompimento	Lavagem	Eluição
Ureia	8 M	8 M	8 M
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	100 mM	100 mM	100 mM
Tris-Cl	10 mM	10 mM	10 mM
pH	8,0	6,3	4,5

#### 4.7.7 Determinação da concentração de proteínas totais

A quantificação das proteínas totais nas amostras foi realizada pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Para reação de Lowry, inicialmente foi preparado o reativo C adicionado na ordem: 50,0 mL do reativo A (solução de NaOH 0,1 M com Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), 500,0 µL do reativo B1 (CuSO<sub>4</sub> 1,0%) e 500,0 µL do reativo B2 (tartarato de sódio e potássio, 2,0%). As amostras foram diluídas (10,0 µL de amostra para 90,0 µL de água deionizada). Em seguida, foi adicionado 1,0 mL do reativo C, os tubos foram homogeneizados em agitador tipo vórtex, e deixados em repouso por 10 minutos. Para finalizar, 100,0 µL do reagente de Folin-Ciocalteu 1,0 N foi adicionado nas amostras, que foram novamente agitadas em vórtex e mantidas em ambiente escuro por 20 minutos. Por fim, a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 650 nm, em cubeta de poliestireno, lavando-se com água destilada entre diferentes amostras. Utilizou-se como branco da reação 1,0 mL do reativo C, 100,0 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e 100 µL do tampão de rompimento celular diluído 1:10 em água destilada, com a finalidade de descontar possíveis interferências da ureia na absorbância das amostras. Todas as leituras foram realizadas em triplicata. A proteína albumina de soro bovino (BSA) foi usada como padrão na concentração de 0,01 a 0,1 (mg/mL).

#### 4.7.8 Eletroforese de proteínas sob condições desnaturantes (SDS-PAGE)

Todas as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de acordo com o protocolo de Laemmli (1970) para análise qualitativa da expressão do antígeno 503. Inicialmente, as amostras contendo as proteínas a serem identificadas foram dialisadas em membrana com poro de 12,0 kDa (Sigma-Aldrich, EUA) contra 4 L de água deionizada a 4° C por 18 h e, em seguida, foram concentradas no equipamento Centrивap

Concentrator (Labconco, EUA). Posteriormente, foram ressuspendidas em 20 µL tampão de amostra (Tris- HCl 0,5 M (pH=6,8), glicerol 10%, SDS 0,4%, 2-mercaptoetanol 2 mmol/L e azul de bromofenol 0,02%) e desnaturadas em banho Maria (TE-184, Tecnal, Brasil) a 90°C durante 5 minutos. O gel de separação com concentração de 12,0% foi preparado utilizando 4,0 mL de acrilamida, 2,5 mL de 30,0% Tris-HCl 1,5 M (pH=8,8), 100,0 µL de SDS 10,0%, 100,0 µL de APS (persulfato de amônio) 10,0%, 4,0 µL de Temed, 3,3 mL de água deionizada. O gel de concentração continha 830,0 µL de acrilamida, 630,0 µL de Tris-HCl (0,5 M) e pH 6,8, 50,0 µL de SDS 10,0%, 50,0 µL de persulfato de amônio 10,0%, 5,0 µL de Temed e água destilada para um volume final de 5,0 mL. Após a polimerização dos géis, e aplicação das amostras, os géis foram submetidos a voltagens de 150 V durante 3 horas, utilizando tampão de corrida – Tris (25,0 mM), Glicina (192,0 mM) e SDS 0,1%, pH 8,3. Quando os compostos adicionados da amostra percorreram todo o gel, a corrida foi encerrada e o gel revelado pelo método colorimétrico da revelação por nitrato de prata (Blum *et al.*, 1987).

#### 4.7.9 Análise quantitativa de antígeno 503

A concentração de antígeno 503 foi determinada por densitometria das bandas de proteínas separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (Seção 4.7.8) utilizando-se o *software* Image J, no qual a imagem digitalizada do gel foi processada gerando curvas, cujos picos são proporcionais à largura e a intensidade de coloração das bandas presentes. O programa utilizou integrações simples para transformar as áreas sob as curvas em valores numéricos. Somando-se as áreas de todos os picos obtidos foi possível obter o valor numérico correspondente à concentração de proteínas totais observadas no gel ( $A_{PT}$ ) (Leitão, 2017). Quantificando apenas a área sob a curva correspondente à proteína recombinante de interesse ( $A_{PI}$ ) obteve-se o valor numérico representativo do antígeno 503 e a partir destes dois valores calculou-se a fração relativa da proteína recombinante em relação à concentração de proteínas totais ( $C_{PT}$ ) determinada pelo método de Lowry (Seção 4.7.7).

A concentração do antígeno 503 ( $C_{a503}$ ) é dada pela Equação 1:

$$C_{a503} = \frac{A_{PI}}{A_{PT}} * C_{PT} \quad (1)$$

Sendo:  $C_{a503}$  = Concentração do antígeno 503 (g/L),  $A_{PI}$  = Área correspondente à concentração de proteína de interesse,  $A_{PT}$  = Área correspondente à concentração de proteínas totais e  $C_{PT}$  = Concentração de proteínas totais (g/L).

## 4.8 Obtenção dos parâmetros cinéticos

### 4.8.1 Cálculo de velocidades específicas

As velocidades específicas de crescimento celular ( $\mu_X$ ) e de formação do produto ( $\mu_P$ ) foram calculadas conforme as Equações 2 e 3, respectivamente.

$$\mu_X = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (2)$$

$$\mu_P = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} \quad (3)$$

Sendo: X = massa celular (g), P = massa de produto (g) e t = tempo (h).

A determinação de  $\mu_X$  e  $\mu_P$  foi realizada conforme método proposto por Le Duy & Zajic (Hiss, 2001).

### 4.8.2 Determinação da fase exponencial de crescimento celular

A velocidade máxima de crescimento microbiano ( $\mu_{\text{máx}}$ ) foi obtida a partir dos dados de crescimento celular obtidos durante os cultivos, por linearização da curva de concentração celular em função do tempo, considerando o melhor coeficiente de regressão (Hiss, 2001).

### 4.8.3 Fator de conversão

O fator de conversão de células em produto que relaciona produto com o crescimento celular foi calculado conforme a equação 4.

$$Y_{P/X} = \frac{P - P_0}{X - X_0} \quad (4)$$

Sendo:  $Y_{P/X}$  = fator de conversão de células em produto (g de produto obtido/ g de biomassa seca), P = Concentração do produto (g/L) no tempo t de cultivo,  $P_0$  = concentração de produto (g/L) no início do cultivo, X = concentração de biomassa seca (g/L) no tempo t de cultivo e  $X_0$  = concentração de biomassa seca (g/L) no início do cultivo.



#### 4.8.4 Produtividade em biomassa ( $P_x$ ) e produtividade em produto ( $P_p$ )

A produtividade em biomassa ( $P_x$ ) é uma definição especial de velocidade que representa um parâmetro importante para avaliar o desempenho de um processo fermentativo (Hiss, 2001), representando a velocidade média de crescimento referente ao tempo de cultivo, conforme a Equação 5.

$$P_x = \frac{X_t - X_0}{T_f} \quad (5)$$

Sendo:  $P_x$  = produtividade em biomassa (g/L.h),  $X_t$  = concentração de biomassa seca (g/L) no tempo  $t$  de cultivo,  $X_0$  = concentração de biomassa seca (g/L) no início do cultivo e  $T_f$  = tempo de cultivo (h).

A produtividade em produto ( $P_p$ ) representa a velocidade média de formação do produto em relação ao tempo de cultivo, conforme a equação 6.

$$P_p = \frac{P_t - P_0}{T_f} \quad (6)$$

Sendo:  $P_p$  = produtividade em produto (g/L.h),  $P_t$  = concentração de produto (g/L) no tempo  $t$  de cultivo,  $P_0$  = concentração de produto (g/L) no início do cultivo e  $T_f$  = tempo de cultivo (h).

---

---

## **Capítulo 5**

### **Resultados e Discussão**

---

---

## 5. Resultados e Discussão

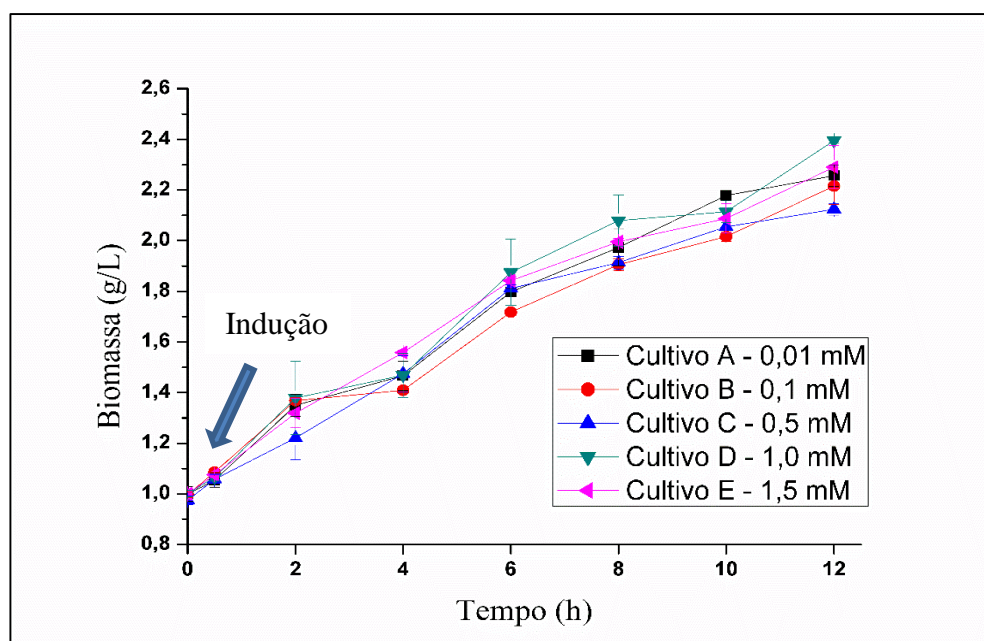
Neste capítulo, os resultados experimentais obtidos, suas análises e discussões são apresentados.

### 5.1 Cultivos para a avaliação do crescimento celular de *E. coli*, expressão do antígeno 503 e estabilidade do plasmídeo utilizando diferentes concentrações de IPTG

Primeiramente, um conjunto de ensaios foi realizado com o objetivo de verificar a expressão da proteína recombinante com adição do indutor IPTG em diferentes concentrações. Nesse caso, buscou-se determinar a melhor concentração de IPTG que irá otimizar a produção do antígeno 503. Os ensaios foram realizados em incubador rotativo, com uma temperatura de cultivo de 37 °C, frequência de agitação de 200 rpm, pH inicial de 7, em Erlenmeyers com capacidade de 250 mL, contendo 50 mL de meio cultura 2xTY. As concentrações de IPTG utilizadas foram de 0,01; 0,1; 0,5; 1,0 e 1,5 mM. O instante de indução foi fixado em 30 minutos. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

O comportamento da concentração celular dos ensaios A, B, C, D e E (Seção 4.5) está representado na Figura 11.

Figura 11. Perfil do crescimento celular para os cultivos induzidos com diferentes concentrações de IPTG, a 37 °C.



Observou-se que o crescimento da biomassa apresentou um comportamento similar em todos os cultivos. Também foi observado que praticamente inexistiu a fase “lag”, ou seja, a fase de adaptação do microrganismo ao meio, que antecede a fase de crescimento exponencial (fase “log”). Isso pode ser explicado devido ao fato de que o microrganismo já está adaptado ao meio. Não foi possível verificar a presença da fase estacionária durante os cultivos, apenas é possível verificar a fase de crescimento exponencial durante as 12 horas, sendo a fase de crescimento máxima durante as 2 horas iniciais de cultivo em todos os ensaios. O teste de Tukey foi realizado e quando fixado um tempo de cultivo, no mínimo 3 ensaios apresentam resultados estatisticamente iguais ( $p < 0,05$ ), indicando que a faixa de concentração de IPTG utilizada não foi capaz de alterar o crescimento celular. Norsyahida *et al.* (2009) utilizaram *E. coli* recombinante para produzir o antígeno BmR1, empregando o IPTG como indutor com concentrações de 1,0 e 5,0 mM, e quando induzida uma única vez, a variação da concentração celular foi a mesma. Collins *et al.* (2013) utilizaram *E. coli* BL21 para produzir proteínas tipo seda-elastina, e verificaram que concentrações de IPTG entre 0,1 e 3,0 mM não eram capazes de alterar a concentração celular máxima e a produtividade específica. Malik *et al.* (2016) observaram o crescimento de *E. coli* BL21 na produção da proteína cHSPA6 utilizando IPTG como indutor, e verificaram que valores entre 0,4 e 1,0 mM de indutor não eram suficientes para variar a concentração de biomassa. De qualquer forma, esse comportamento precisa ser caracterizado para o vetor, cepa hospedeira e proteína empregada no cultivo.

A evolução do pH ao longo dos cultivos é mostrada na Figura 12. Durante os primeiros 30 minutos o pH do meio diminui um pouco sendo possível verificar a formação de ácido acético (Figura 13). Após a indução com IPTG, o comportamento se altera, ao invés do pH decair ele aumenta e após o cultivo final o pH do meio se torna levemente básico, com valores de até 8,5. Esse comportamento se dá quando o meio utilizado é complexo, que é o caso do 2xTY que possui extrato de levedura e triptona em sua composição. Quando as células usam esses nutrientes para o crescimento, íons amônio são formados devido ao metabolismo dos aminoácidos/proteínas, aumentando assim o pH (Mikami *et al.*, 2017).

Figura 12. Perfil da variação do pH durante os cultivos induzidos com diferentes concentrações de IPTG, a 37 °C.

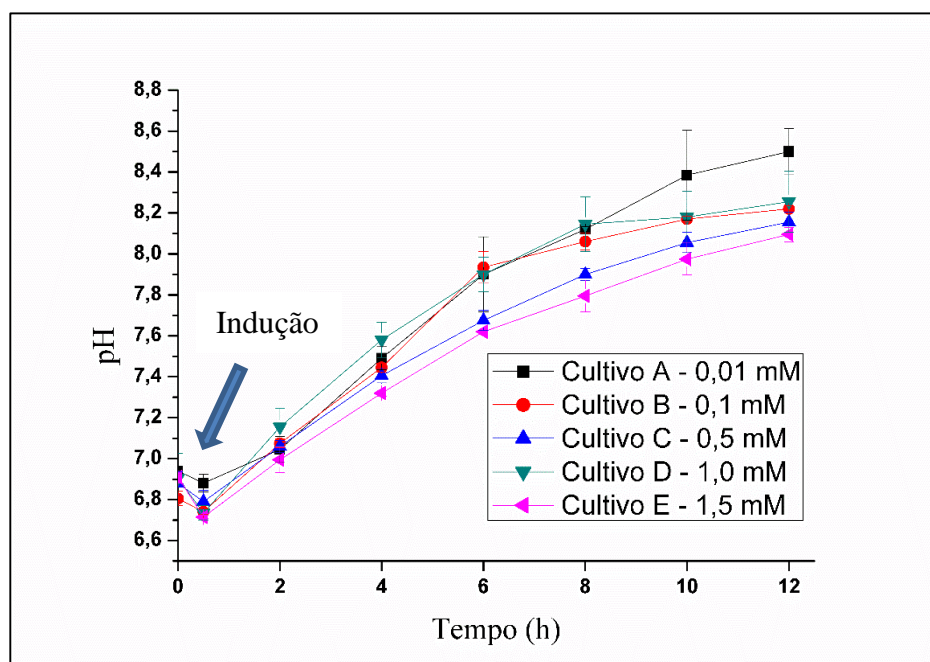
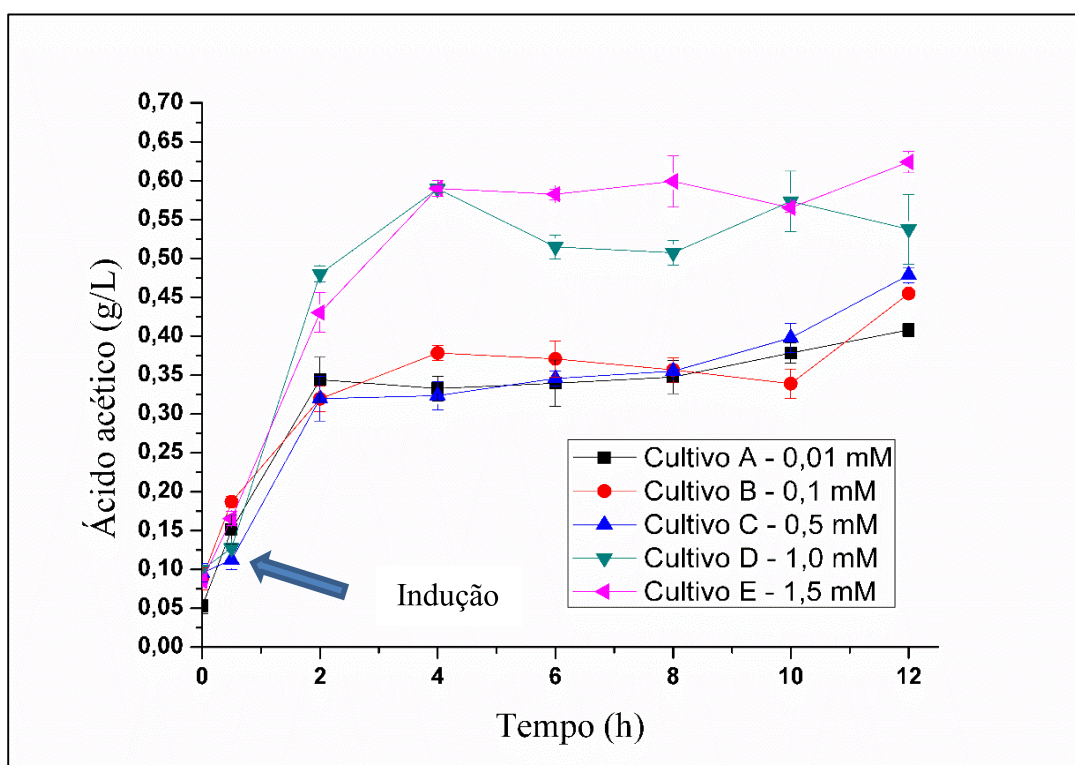


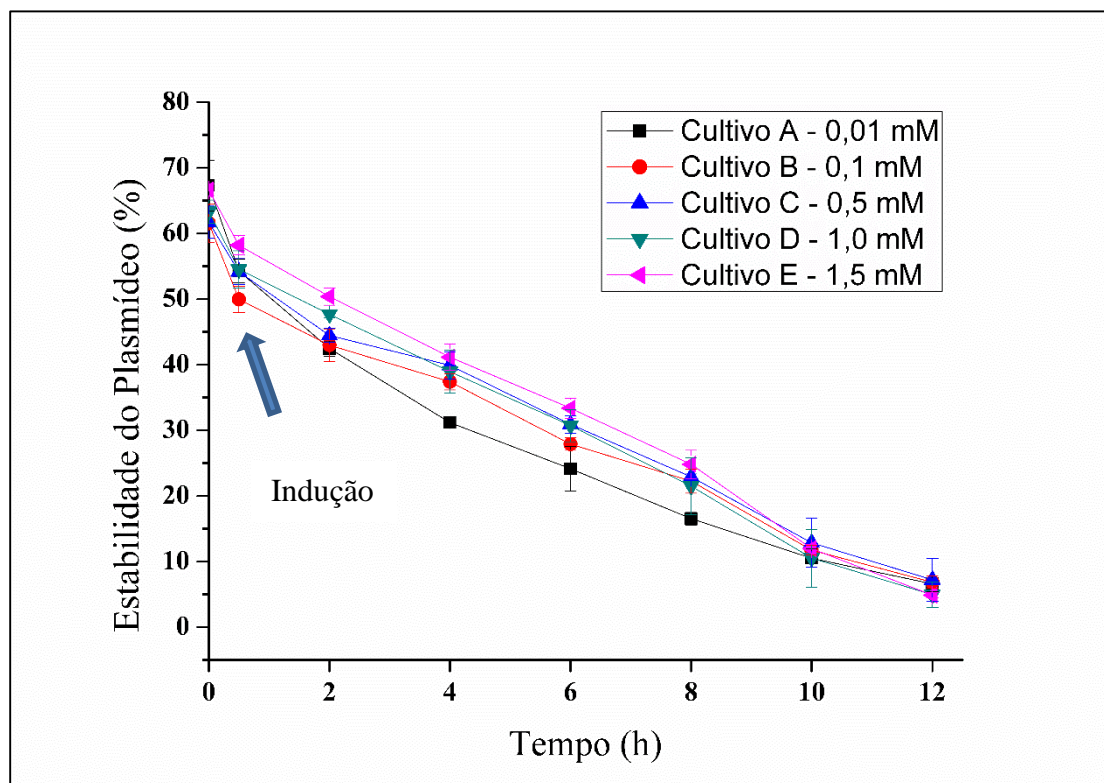
Figura 13. Perfil da formação de ácido acético durante os cultivos induzidos com diferentes concentrações de IPTG, a 37 °C.



Os ensaios C e E apresentaram os menores valores de pH após a finalização do cultivo, enquanto que para o ensaio A, em que a indução utilizou a menor concentração de IPTG, o meio de cultivo após as 12 horas apresentou o maior pH ( $8,50 \pm 0,11$ ). Destaca-se que a concentração de ácido acético formado durante os cultivos foi sempre menor que 0,9 g/L, não sendo suficiente para inibir o crescimento celular (Xue *et al.*, 2010). É observado que para concentrações acima de 0,5 mM de IPTG, quanto maior a concentração, maior a formação do ácido acético. A expressão de DNA heterólogo e produção de proteínas recombinantes requer precursores para síntese proteica e demanda de energia, e provoca uma carga metabólica para as células. Essa perturbação é refletida diretamente nos fluxos metabólicos e na fisiologia celular. A fim de compensar o aumento da demanda de energia, o metabolismo celular é reorganizado para a regeneração de ATP. Esta regeneração é obtida através da conversão de NADPH, gerada no ciclo de Krebs, para NADH através de uma transidrogenase e, posteriormente, os ATPs são regenerados por fosforilação oxidativa. A formação adicional de ATP pode ser obtida através da reorganização dos fluxos metabólicos, aumentando o fluxo de piruvato para acetil-CoA e, posteriormente, para o ácido acético, provocando o acúmulo indesejado de ácido acético no meio (Lecina *et al.*, 2013).

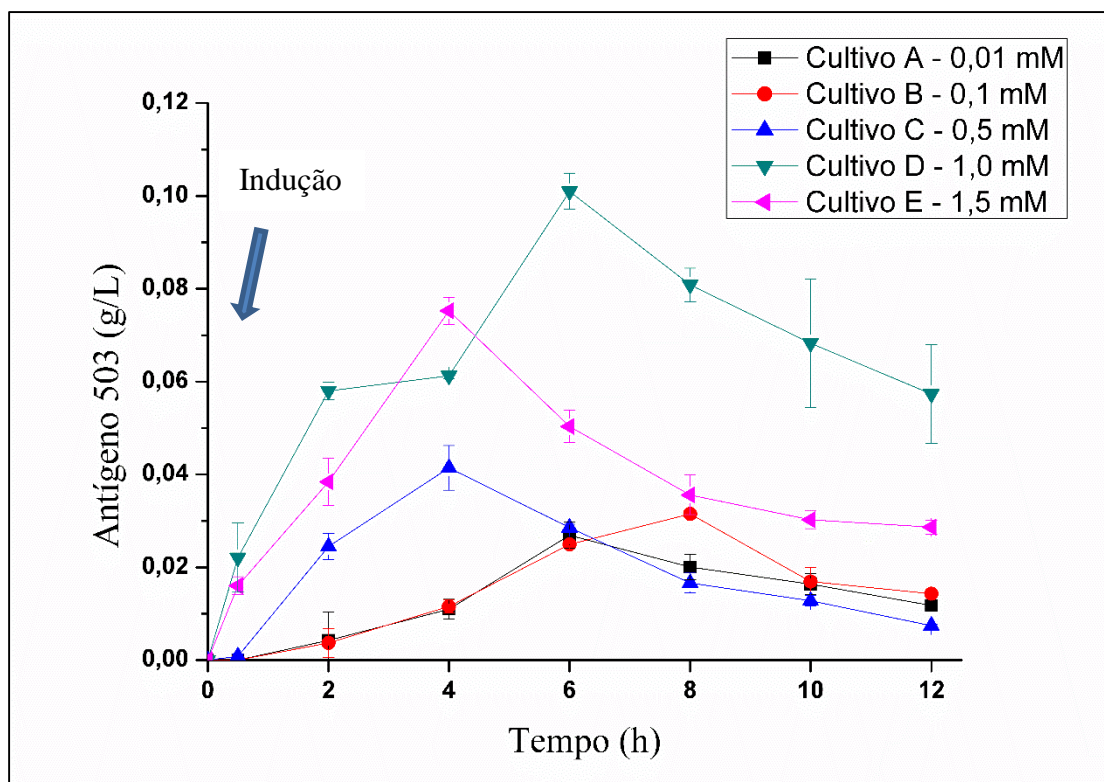
A Figura 14 ilustra o perfil da estabilidade do plasmídeo durante o cultivo. Observa-se que a estabilidade do plasmídeo é fortemente comprometida no decorrer do cultivo. No início do cultivo, a estabilidade plasmidial apresenta valores entre 60 e 70% e após 12 horas de cultivo esses valores são menores do que 10%. Destaca-se que a estabilidade no início do cultivo não iniciou com 100%, sabe-se que a existência do próprio plasmídeo gera um estresse para a célula (Silva *et al.*, 2012). Assim, a perda do plasmídeo pela célula já ocorre durante ativação do microrganismo, ou seja, ao se iniciar o cultivo já ocorre, em média, perda plasmidial de 35%. Não houve diferença estatística entre os valores de estabilidade plasmidial durante os cultivos com mudança de concentração de IPTG, exceto durante o cultivo A entre 4 e 8 horas. A instabilidade plasmidial provavelmente não está relacionada com a composição do meio 2xTY, uma vez que Goyal *et al.* (2009) verificaram que meios de cultivo com extrato de levedura e/ou triptona não afetam a estabilidade do plasmídeo.

Figura 14. Perfil da estabilidade do plasmídeo durante os cultivos induzidos com diferentes concentrações de IPTG, a 37 °C.



A Figura 15 apresenta o perfil de concentração do antígeno 503 ao longo do cultivo. Observa-se que para as condições avaliadas, aumentando-se a concentração de IPTG, eleva-se a concentração do antígeno, passando por um valor máximo, sendo então reduzida. A melhor condição para a produção do antígeno 504 foi observada no ensaio D, ou seja, ao se utilizar 1,0 mM de IPTG, após 6 horas alcançando um valor de 0,1 g/L. É possível verificar que mesmo a menor concentração de IPTG (0,01 mM) foi o suficiente para induzir a expressão da proteína recombinante, sendo que o aumento da concentração do IPTG favoreceu a expressão do antígeno 503. Vaz (2011) induziu a expressão do antígeno 503 com 1mM nas mesmas condições e obteve 0,083 g/L de proteína recombinante após 6 horas de cultivos. Foi observada, também, a diminuição da produção da molécula alvo após 6 horas de cultivo. Ao se comparar as Figuras 14 e 15 observa-se, que a estabilidade do plasmídeo parece não influenciar na concentração do antígeno 503. Observa-se, também, que o tempo de máxima produção do antígeno parece não estar correlacionado com a concentração de IPTG, conforme é apresentado na Tabela 6. Hu *et al.* (2014) utilizaram *E. coli* para produzir a proteína recombinante L23a e quando induzida com IPTG com concentrações entre 0,1 e 1,2 mM, não houve mudança significativa na expressão da proteína.

Figura 15. Perfil da produção do antígeno 503 durante os cultivos induzidos com diferentes concentrações de IPTG, a 37 °C.



A Tabela 6 ilustra os resultados para biomassa, concentração de antígeno 503 e concentração de ácido acético em função do tempo em que a produção do antígeno foi máxima, considerando a influência da concentração do indutor. A partir dos resultados dos cultivos, se estimou os parâmetros cinéticos, conforme é mostrado na Tabela 7.

Tabela 6. Condições para produção máxima de antígeno 503 nos cultivos com variação da concentração de IPTG.

Cultivo	[IPTG] (mM)	Tempo (h)	Biomassa (g/L)	Antígeno 503 (g/L)	Ácido Acético (g/L)
<b>A</b>	0,01	6	1,80 ± 0,01	0,027 ± 0,003	0,34 ± 0,03
<b>B</b>	0,1	8	1,91 ± 0,02	0,032 ± 0,001	0,35 ± 0,02
<b>C</b>	0,5	4	1,47 ± 0,07	0,041 ± 0,005	0,32 ± 0,02
<b>D</b>	1,0	6	1,87 ± 0,13	0,101 ± 0,004	0,51 ± 0,01
<b>E</b>	1,5	4	1,56 ± 0,01	0,075 ± 0,003	0,59 ± 0,01

Para os cultivos realizados, a expressão do antígeno 503 apresenta comportamento associado ao crescimento. O perfil mostrado nos cultivos, passando por um máximo, ou seja, havendo uma diminuição da proteína recombinante pode ser explicada pelo fato de que a célula, ao ter limitada sua fonte de carbono e outros nutrientes no meio, ativa suas proteases, hidrolisando as proteínas internas para satisfazer suas necessidades energéticas e nutricionais



(Vaz, 2011). Em todos os cultivos foi observado um comportamento que consistiu na redução da proteína recombinante com o aumento da biomassa. Conforme Tabela 7, a velocidade máxima específica de crescimento dentre os cultivos realizados foi de  $0,163 \text{ h}^{-1}$  durante o cultivo D. Sendo também o de maior produtividade de antígeno. Com relação ao fator de conversão de célula em produto, a ensaio E obteve o maior valor de  $0,134 \text{ g}$  de antígeno por  $\text{g}$  de massa seca.

Observa-se na Figura 16 que após a indução a velocidade de crescimento específica diminui consideravelmente ao longo do tempo. Uma hipótese é que a redução desta velocidade foi originada pela síntese rápida da proteína de interesse acarretando uma mudança do metabolismo de crescimento para o de expressão da proteína.

Figura 16. Perfil da velocidade de crescimento específica durante os cultivos induzidos com diferentes concentrações de IPTG, a  $37^\circ\text{C}$ .

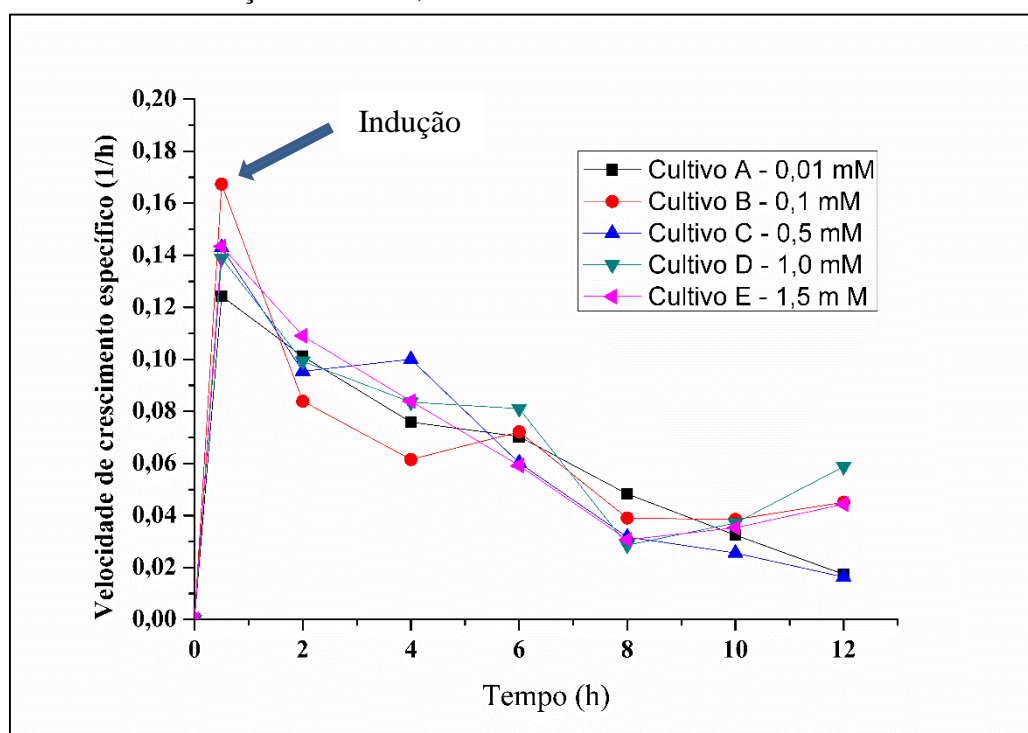


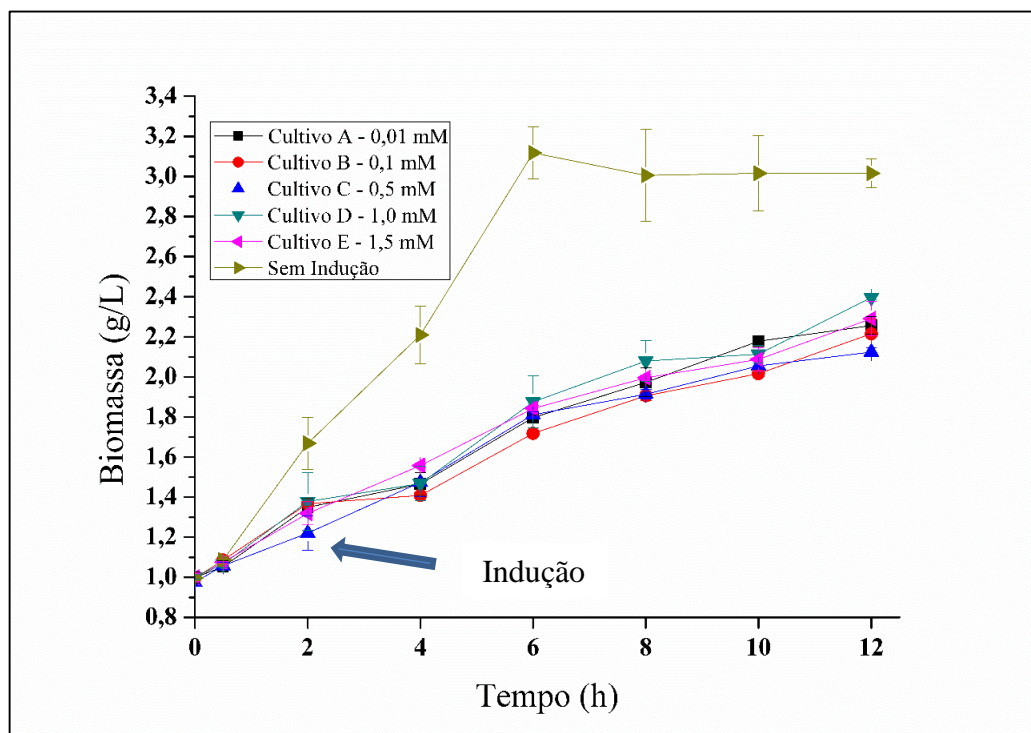
Tabela 7. Parâmetros cinéticos, no instante de indução, dos cultivos com variação da concentração de IPTG.

Cultivo	$\mu_x$ (1/h)	$\mu_{máx}$ (1/h)	$\mu_p$ (1/h)	$Y_{p/x}$ (g/g MS)	$P_x$ (g/Lh)	$P_p$ (g/g MS)
A	0,124	0,154	0,001	0,034	0,109	0
B	0,167	0,157	0,001	0,035	0,179	0
C	0,143	0,101	0,004	0,088	0,165	0
D	0,139	0,163	0,036	0,116	0,128	0,044
E	0,143	0,138	0,026	0,134	0,151	0,014

## 5.2 Cultivo para a avaliação do crescimento celular de *E. coli* e estabilidade do plasmídeo sem adição de indutor

Um ensaio em duplicata foi realizado a fim de verificar qual a influência da não-indução no crescimento celular e na estabilidade do plasmídeo. Esse cultivo foi realizado nas mesmas condições que os cultivos anteriores, exceto que não houve indução por IPTG. Os resultados foram comparados com os cultivos anteriores e estão representados na Figuras 17 e 18 abaixo.

Figura 17. Perfil do crescimento celular durante os cultivos com indução e sem indução de IPTG, a 37 °C.



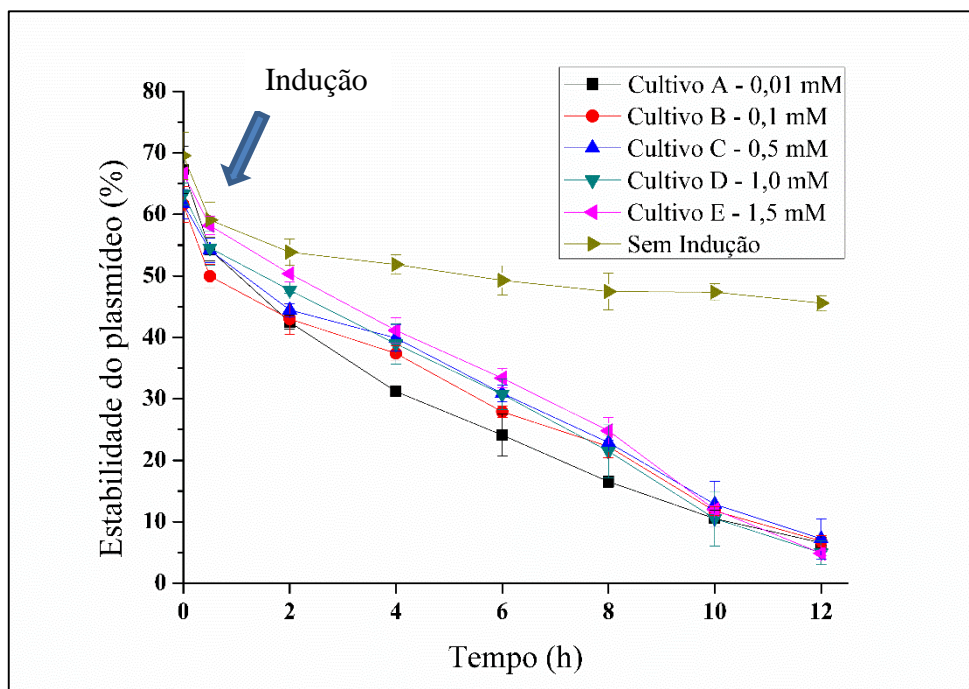
Conforme ilustra a Figura 17, foi observado que praticamente inexiste a fase “lag” durante o cultivo sem indução, comportamento semelhante aos outros cultivos, confirmando a adaptação do microrganismo ao meio. Diferentemente dos cultivos induzidos, foi possível verificar a fase estacionária. Também foi possível verificar o maior crescimento de biomassa (1,41 vezes maior) e velocidade máxima específica de crescimento (1,85 vezes maior) em relação à média dos cultivos induzidos por IPTG. O  $\mu_{\text{máx}}$  para o cultivo sem indução foi de  $0,264 \text{ h}^{-1}$ , valor bem superior aos outros valores de  $\mu_{\text{máx}}$  das cinéticas com IPTG (Tabela 7). A toxicidade do IPTG promove um estresse metabólico e uma redução no crescimento do

microrganismo, assim, a indução promove uma mudança na maquinaria de expressão gênica principalmente para a produção da proteína recombinante (Vaz *et al.*, 2015).

Larentis *et al.* (2014) verificaram uma diminuição da velocidade de crescimento da *E. coli* BL21 quando esta foi induzida com 0,55 mM de IPTG ao se comparar com o cultivo que não houve indução. Malik *et al.* (2016) também utilizaram a *E. coli* BL21 para produzir a proteína cHSPA6 e relataram que no cultivo não induzido a produção de biomassa foi quase duas vezes maior que o cultivo induzido com 1 mM de IPTG. Vaz (2011) produziu o antígeno 503 através da indução com 1,0 mM de IPTG em *E. coli* M15 e verificou que nos cultivos sem a adição do indutor, a produção de biomassa era quase 1,5 vezes maior do que nos cultivos induzidos.

Com relação à estabilidade do plasmídeo, conforme mostrado na Figura 18, é possível verificar que a expressão do antígeno 503 é uma das causas da instabilidade do plasmídeo pQE-30 devido à carga imposta pela expressão da proteína recombinante. Ao final do cultivo, a estabilidade foi em torno de 45%, enquanto que nos cultivos induzidos a estabilidade final foi menor que 10%. Tomazetto *et al.* (2007) verificaram a instabilidade do pET101/jaburetox-2Ec devido à carga metabólica imposta pela expressão do jaburetox-2Ec. Marisch *et al.* (2013) utilizaram a *E. coli* BL21 para produção de proteínas recombinantes e observaram que 7 horas após a indução houve uma perda de 40% na estabilidade do plasmídeo, sendo que após 21 horas não existia mais células com o plasmídeo pET30a justificando a instabilidade devido a expressão da proteína recombinante.

Figura 18. Perfil da estabilidade do plasmídeo durante os cultivos com indução e sem indução de IPTG, a 37 °C.

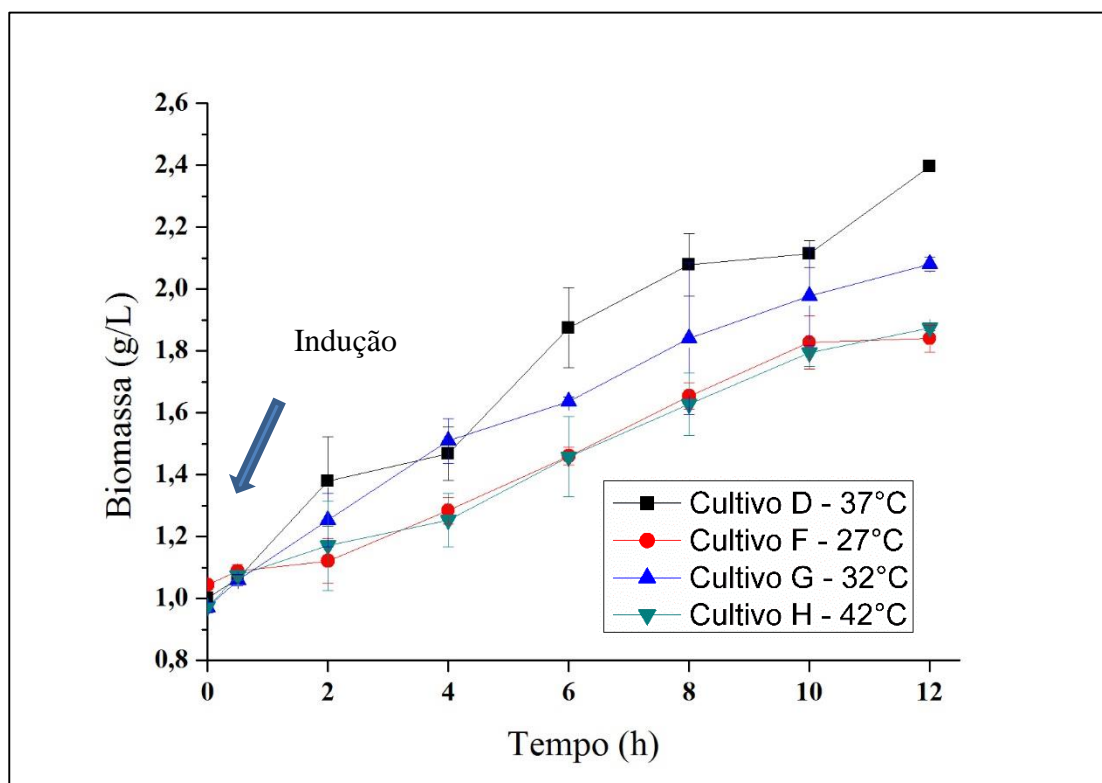


### 5.3 Cultivos para a avaliação do crescimento celular de *E. coli*, expressão do antígeno 503 e estabilidade do plasmídeo utilizando diferentes temperaturas de cultivo

Após o primeiro conjunto de ensaios em que se avaliou a concentração do indutor que favorece a indução do antígeno 503, avaliou-se a temperatura de cultivo que poderia favorecer a indução da molécula alvo. Nesse caso, a melhor concentração de IPTG (1,0 mM - Cultivo D) que favoreceu a produção do antígeno 503 foi mantida. Os ensaios foram realizados em incubador rotativo, com as seguintes temperaturas de cultivo: 27, 32 e 42 °C, frequência de agitação de 200 rpm, pH inicial de 7, em Erlenmeyer com capacidade de 250 mL, contendo 50 mL de meio cultura 2xTY. O tempo de indução foi fixado em 30 minutos. Todos os ensaios foram realizados em duplicata. Os ensaios foram comparados com o ensaio D em que a concentração de IPTG foi 1,0 mM e a temperatura de cultivo de 37 °C.

O perfil da concentração celular dos ensaios D, F, G e H (Seção 4.6) está ilustrado na Figura 19.

Figura 19. Perfil do crescimento celular durante os cultivos com diferentes temperaturas de cultivo, induzidos com 1,0 mM de IPTG.



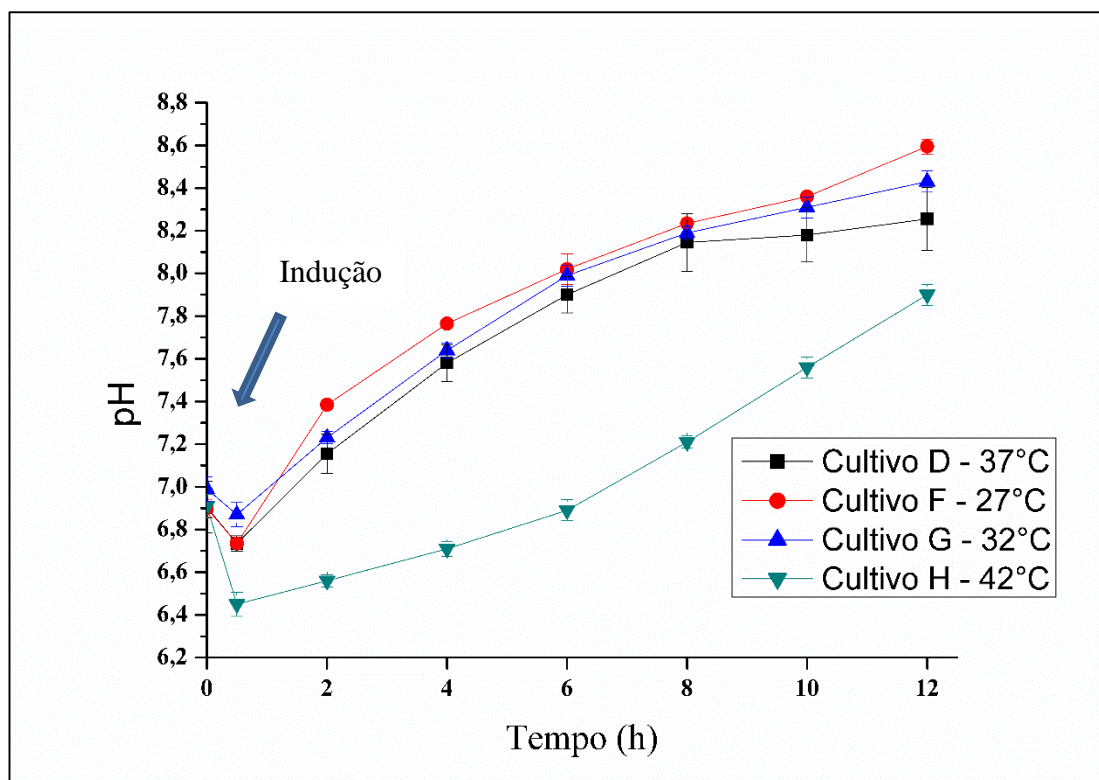
Observa-se que a temperatura ótima de crescimento da *E. coli* é 37 °C, corroborando com os dados da literatura, apresentando um máximo de  $2,39 \pm 0,01$  g/L. Com o aumento do cultivo da temperatura para 42 °C, a produção de biomassa decresceu, chegando a um máximo de  $1,87 \pm 0,01$  g/L, que interessantemente se apresentou comportamento próximo ao cultivo com a menor temperatura. Para essa menor temperatura a produção de biomassa máxima atingiu máximos de  $1,83 \pm 0,04$  g/L que foi um pouco menor que aquele obtido para o cultivo a 32 °C ( $2,08 \pm 0,02$  g/L). O teste de Tukey foi realizado e verificou-se que o crescimento celular durante os cultivos F e H foram estatisticamente iguais durante todo o cultivo. De acordo com Noor *et al.* (2013), a temperatura ótima de crescimento de *E. coli* está compreendida entre 37 e 39 °C. Rudolph *et al.* (2010) constataram que *E. coli* MG1655 pode crescer até a temperatura de 48,5 °C, porém a temperatura ótima de cultivo é de 37 °C. Já Rattanabumrung *et al.* (2012) relataram que uma linhagem de *E. coli* não sobreviveu na temperatura de 45 °C. Logo, valores acima da temperatura ótima de cultivo (37 °C) tendem a diminuir o crescimento da bactéria recombinante. Nguyen (2006) comparou o crescimento celular de *E. coli* DH5α nas temperaturas de 28, 37 e 45 °C e observou que após 24 horas, a bactéria conseguiu crescer mais na temperatura de 37 °C, enquanto que houve uma média de 35 e 32% menos células, na temperatura de 28 e 45 °C, respectivamente. Collins *et al.* (2013)



analisaram a produção de *E. coli* BL21 e verificaram que a faixa de temperatura de 37 a 42 °C foram mais desejáveis quando comparadas a 25 °C.

O perfil do pH dos cultivos é apresentado na Figura 20. Conforme comentado anteriormente, destaca-se que o valor inicial ajustado no meio de cultivo foi de 7,0, porém devido a ativação do microrganismo o pH inicial do cultivo decresce para valores entre 6,8 e 7,0 provavelmente pela formação de ácido acético (Figura 21). Durante os primeiros 30 minutos o pH do meio diminui um pouco sendo possível verificar a formação de ácido acético, sendo a maior diminuição de pH o cultivo H quando a temperatura é de 42 °C atingindo o menor valor de  $6,45 \pm 0,05$ . Após a indução com IPTG, o comportamento do pH do cultivo é alterado da mesma forma que nos cultivos na qual se avaliou a indução por diferentes concentrações de IPTG (Figura 12) com valor máximo de  $8,59 \pm 0,04$ .

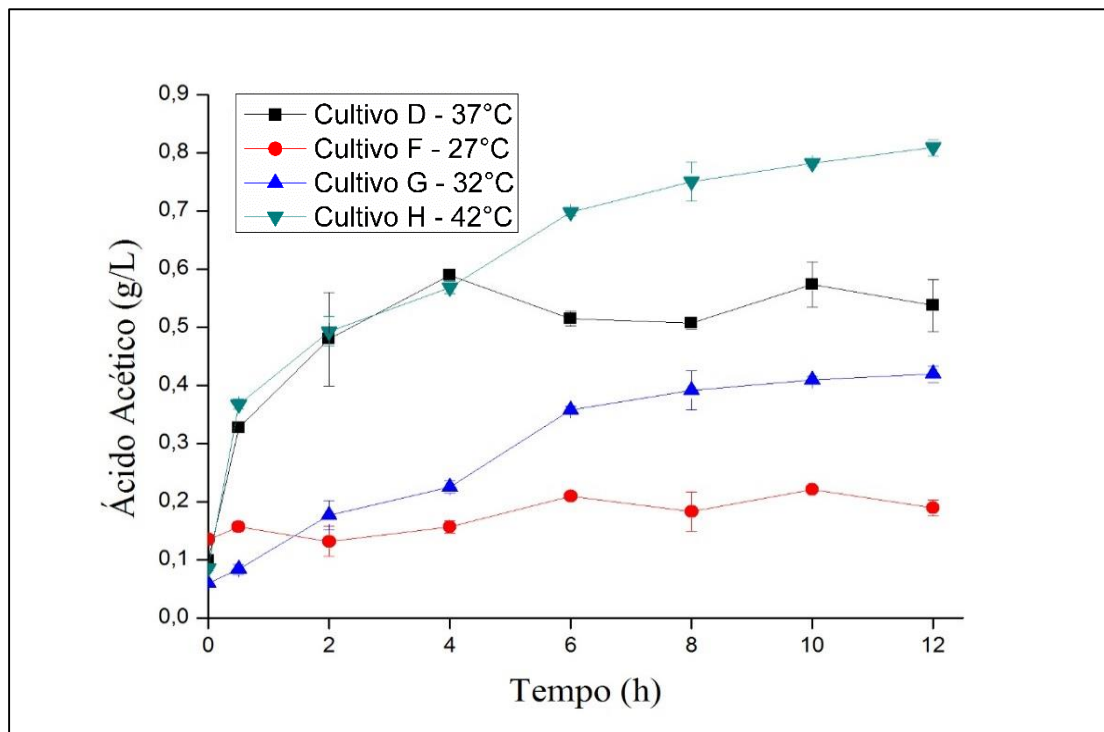
Figura 20. Perfil da variação do pH durante os cultivos com diferentes temperaturas de cultivo, induzidos com 1,0 mM de IPTG.



A Figura 21 ilustra a concentração de ácido acético durante os cultivos. É possível verificar que as maiores temperaturas de cultivo favoreceram a maior produção de ácido acético com o maior valor após 12 horas de cultivo na temperatura de 42 °C ( $0,81 \pm 0,01$  g/L). A formação de ácido acético, em cultivos de *E. coli*, tem sido frequentemente discutida na

literatura e há um consenso na necessidade de se evitar a formação desse metabólito, uma vez que um dos problemas da expressão em *E. coli* é o acúmulo de acetato ao longo do cultivo o que contribui para redução do crescimento e expressão da proteína alvo (Vaz *et al.*, 2015). A maior produção de ácido acético tende a diminuir o pH, o que é verificado na Figura 20. Logo, é possível afirmar que quanto maior a temperatura de cultivo, maior a concentração de ácido acético no meio e, conseqüentemente, menor o pH de cultivo. Maiores temperaturas podem diminuir a troca metabólica da célula com o meio de cultivo e desviar o seu metabolismo para a formação de ácido acético (Woo *et al.*, 2014). Li (2014) observou o aumento da concentração de ácido acético quando a temperatura de cultivo ia de 30 para 40 °C. Uma variável importante que pode ser utilizada para controlar o metabolismo celular é a temperatura do meio de cultivo. Ao conduzir a diminuição da temperatura de 37 °C para 30 °C, Carnes (2005) verificou a redução da capacidade de consumo de nutrientes, bem como a taxa específica de crescimento máxima, minimizando-se os efeitos tóxicos dos produtos metabólicos secundários, a geração de calor e carência de oxigênio.

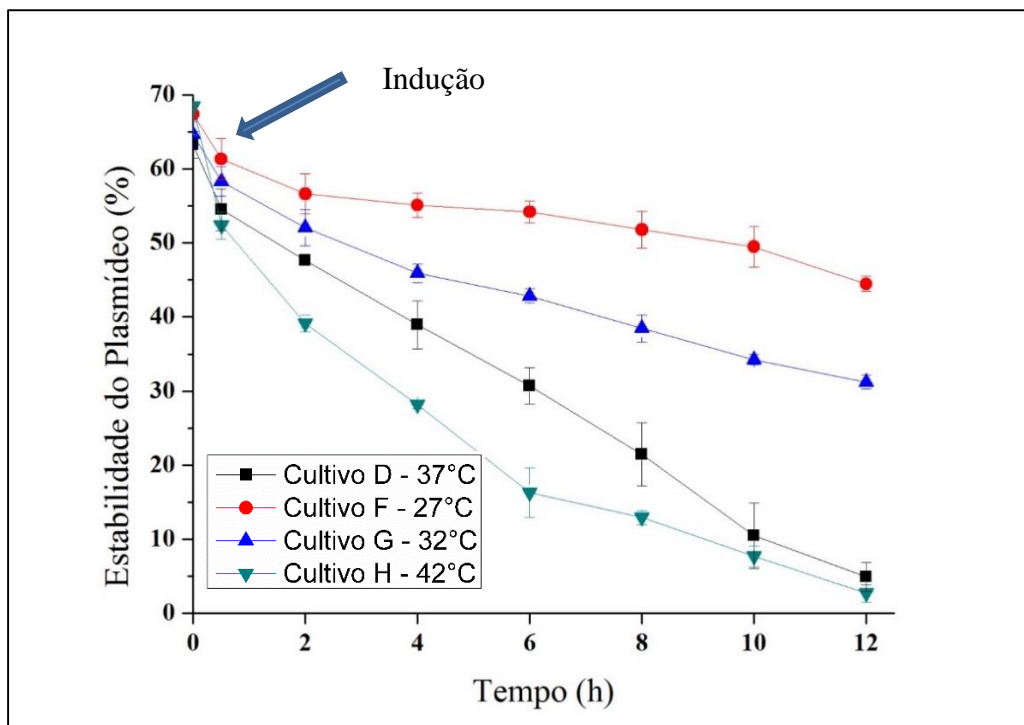
Figura 21. Perfil da formação de ácido acético durante os cultivos com diferentes temperaturas de cultivo, induzidos com 1,0 mM de IPTG.



Em se tratando da estabilidade plasmidial, conforme ilustrado na Figura 22, menores temperaturas de cultivo favoreceram a menor instabilidade do plasmídeo. No cultivo a 27 °C, a estabilidade após 12 horas de cultivo foi de  $44,5 \pm 1,0$  %. Entretanto, no cultivo realizado a 42 °C, as células praticamente não tinham mais o plasmídeo pQE-30 ( $2,7 \pm 1,2$  %). Esses

resultados corroboram com os relatados na literatura em relação à maior retenção de plasmídeo em temperaturas menores (Bohaychuk *et al.*, 2008; Cotrim *et al.*, 2010; Afonso *et al.*, 2015). Nessas condições, a duplicação celular ocorre mais lentamente, facilitando a distribuição do plasmídeo de forma mais homogênea entre as células filhas (Santos, 2012). A menor retenção do plasmídeo está provavelmente relacionada ao metabolismo mais acelerado nas temperaturas mais elevadas, acentuando o problema de formação de células filhas que não carregam o plasmídeo (Rinas, 1996). Além disso, uma maior degradação do antibiótico em temperaturas mais elevadas pode estar associada à menor retenção de plasmídeo observada neste trabalho (Tripathi *et al.*, 2009). A temperatura afeta a estabilidade do plasmídeo e, consequentemente, a expressão da proteína (Zhang *et al.*, 2009a). Portanto, a diminuição da temperatura durante a fase de indução constitui um método simples e eficaz para aumentar a produção da proteína recombinante (Shojaosadati *et al.*, 2008). Santos (2012) cultivou *E. coli* BL21, contendo o plasmídeo pET37b+, nas temperaturas de 25, 31 e 37 °C e observou que para temperatura mais baixa, houve maior retenção do plasmídeo se comparado a temperatura mais alta.

Figura 22. Perfil da estabilidade do plasmídeo durante os cultivos com diferentes temperaturas de cultivo, induzidos com 1,0 mM de IPTG.

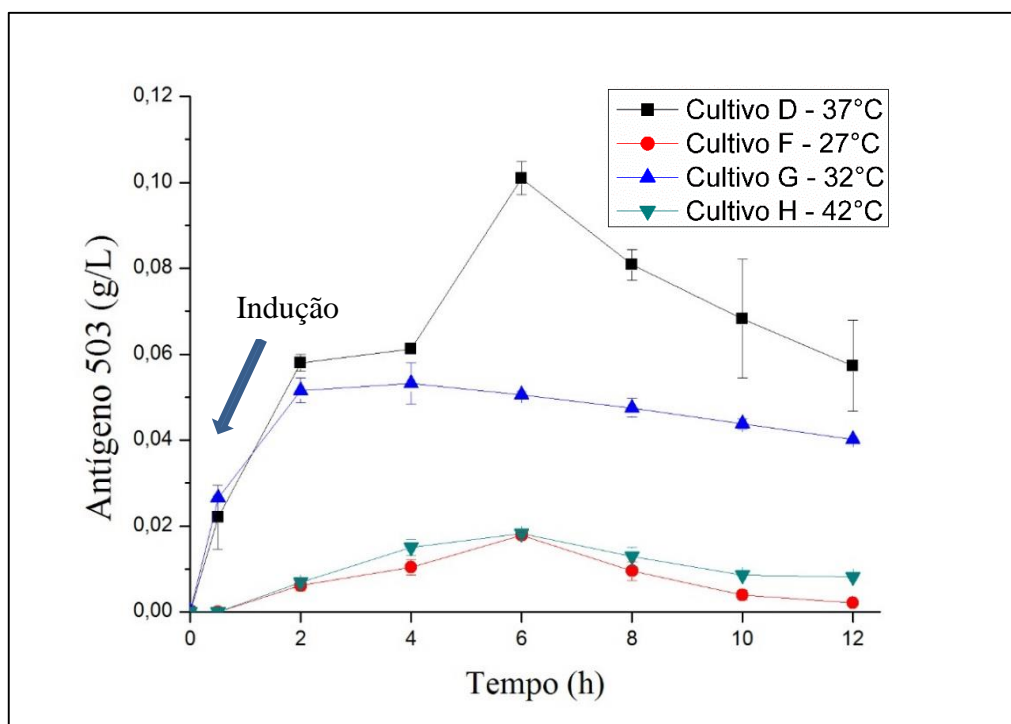


Com relação a produção de antígeno 503 (Figura 23), a menor temperatura (27 °C) não favoreceu a expressão da proteína recombinante, sendo a maior produção após 6 horas de  $0,018 \pm 0,001$  g/L. Valor 5,6 vezes menor que o obtido após 6 horas de cultivo na temperatura de 37 °C ( $0,101 \pm 0,004$  g/L). Na maior temperatura (42 °C) foi obtido a maior concentração



de antígeno após 6 horas ( $0,018 \pm 0,001$  g/L), sendo o mesmo valor que foi obtido no cultivo F a 27 °C. Hu *et al.* (2014) utilizaram *E. coli* para produzir a proteína recombinante L23a e verificaram a maior concentração da proteína na temperatura de 37 °C, havendo uma redução da expressão proteica com o aumento da temperatura para 40 °C e redução da expressão nas temperaturas de 35, 30, 25 e 20 °C. Altas temperaturas tendem a favorecer um rápido crescimento celular, porém, desfavorece a produção da proteína heteróloga, uma vez que o aumento da temperatura afeta a estabilidade do plasmídeo e consequentemente a expressão da proteína (Zhang *et al.*, 2009a). Jhamb & Sahoo (2012) estudaram o cultivo da *E. coli* BL21 para expressão de DnaKJE induzido com 1,0 mM de IPTG e verificaram que a diminuição da temperatura de cultivo de 37 para 20 °C diminui a velocidade de crescimento específica e a expressão da proteína recombinante. Temperaturas de cultivo mais baixas geralmente levam a uma menor formação de corpos de inclusão devido a uma menor taxa de síntese proteica, alterações no nível de estresse celular, redução da taxa de agregação e diminuição das interações hidrofóbicas entre os polipeptídeos (Fink, 1998). Porém, no caso do antígeno 503, menores temperaturas não aumentaram na expressão do mesmo, mesmo tendo maior estabilidade do plasmídeo. Um dos motivos da expressão ter sido baixa pode ser devido ao menor crescimento celular obtido durante o cultivo quando comparada as de maior temperatura.

Figura 23. Perfil da produção do antígeno 503 durante os cultivos com diferentes temperaturas de cultivo, induzidos com 1,0 mM de IPTG.



A Tabela 8 apresenta os resultados para biomassa, concentração de antígeno 503 e concentração de ácido acético em função do tempo em que a produção do antígeno foi máxima, considerando a influência da temperatura. A partir dos resultados dos cultivos, se estimou os parâmetros cinéticos, conforme é mostrado na Tabela 9.

Tabela 8. Condições para produção máxima de antígeno 503 nos cultivos induzidos com 1,0 mM em diferentes temperaturas.

Cultivo	Temp. (°C)	Tempo (h)	Biomassa (g/L)	Antígeno 503 (g/L)	Ácido Acético (g/L)
<b>F</b>	27	6	1,46 ± 0,03	0,018 ± 0,001	0,21 ± 0,01
<b>G</b>	32	4	1,51 ± 0,07	0,053 ± 0,001	0,23 ± 0,01
<b>D</b>	37	6	1,87 ± 0,13	0,101 ± 0,004	0,51 ± 0,01
<b>H</b>	42	6	1,46 ± 0,13	0,018 ± 0,001	0,69 ± 0,01

Para os cultivos realizados, mais uma vez, a expressão do antígeno 503 apresenta comportamento associado ao crescimento. Após os tempos em que a produção de antígeno é máxima, há uma diminuição da proteína recombinante que pode ser explicada pelo fato de que a célula, ao ter limitada sua fonte de carbono e outros nutrientes no meio, ativa suas proteases, hidrolisando as proteínas internas para satisfazer suas necessidades energéticas e nutricionais (Vaz *et al.*, 2015). Em todos os cultivos foi observado um comportamento que consistiu na redução da proteína recombinante com o aumento da biomassa. A maior produção de antígeno foi no cultivo induzido com 1,0 mM a 37 °C que foi de 0,101 ± 0,004 g/L.

Observa-se na Figura 24 que após a indução a velocidade de crescimento específica diminui consideravelmente ao longo do tempo. A queda mais acentuada é no cultivo realizado a 42 °C, porém a produção proteica não foi favorecida nesse caso. O cultivo realizado na temperatura de 27 °C não obteve altos valores de velocidade específica durante a indução.

Figura 24. Perfil da velocidade de crescimento específica durante os cultivos induzidos com diferentes temperaturas, com 1,0 mM de IPTG.

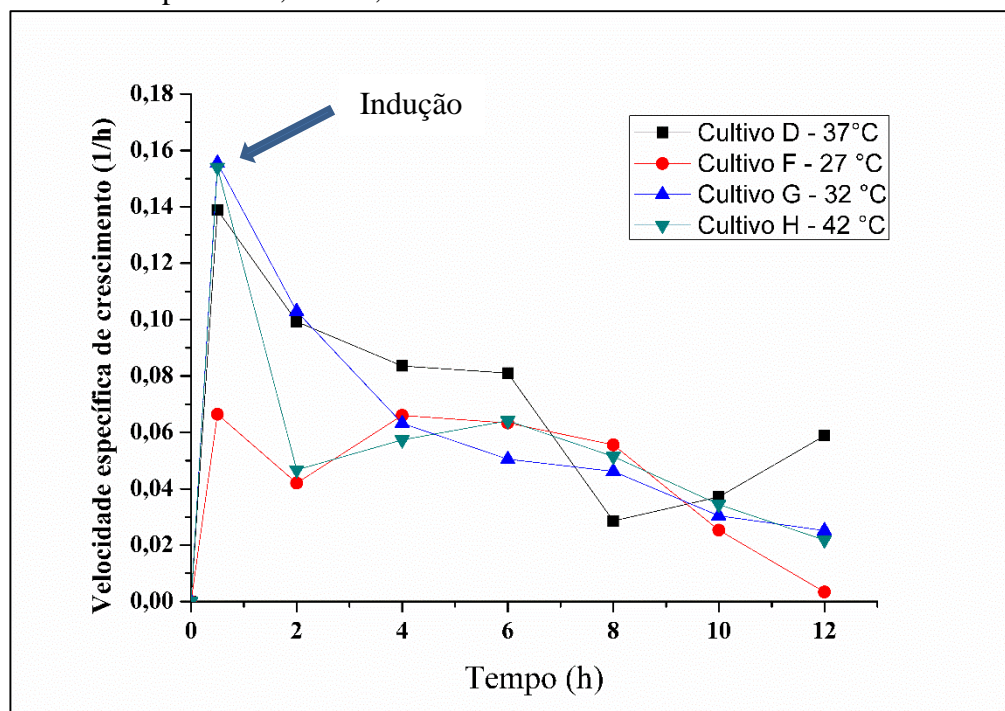


Tabela 9. Parâmetros cinéticos, no instante de indução, nos cultivos induzidos com 1,0 mM em diferentes temperaturas.

Cultivo	$\mu_x$ (1/h)	$\mu_{máx}$ (1/h)	$\mu_P$ (1/h)	$Y_{p/x}$ (g/g MS)	$P_x$ (g/Lh)	$P_{p/x}$ (g/Lh)
F	0,066	0,075	0	0,043	0,089	0
G	0,156	0,1081	0,041	0,099	0,176	0,025
D	0,139	0,163	0,037	0,116	0,128	0,044
H	0,154	0,1079	0,001	0,038	0,200	0

A velocidade máxima específica de crescimento dentre os cultivos realizados foi de  $0,163 \text{ h}^{-1}$  que foi obtida durante o cultivo D. Sendo também o de maior produtividade em células e produtividade de antígeno. Já com relação ao fator de conversão de célula em produto, a cinética D também obteve o maior valor de 0,116 g de antígeno por g de massa seca.

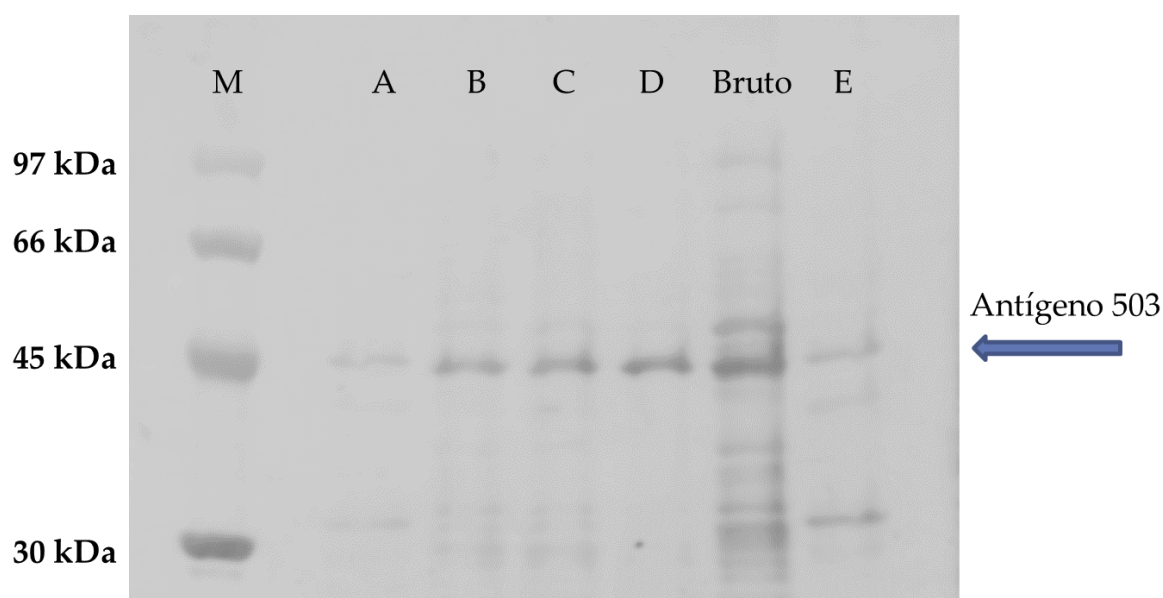
#### 5.4 Avaliação da expressão da proteína recombinante por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

A eletroforese foi realizada para possibilitar a visualização das bandas proteicas da proteína de interesse (antígeno 503) utilizando a *E. coli* M15 como hospedeiro. A expressão da proteína recombinante foi avaliada qualitativamente por eletroforese em gel do tipo SDS-

PAGE (Laemmli, 1970). A proteína de interesse foi determinada quantitativamente por densitometria das bandas de proteínas separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida utilizando-se o software Image J a partir das proteínas totais obtidas pelo método de Lowry.

Os pontos experimentais utilizados nas eletroforeses abaixo (Figuras 25 e 26) correspondem aos que apresentaram maior concentração de antígeno 503 (Tabelas 6 e 8).

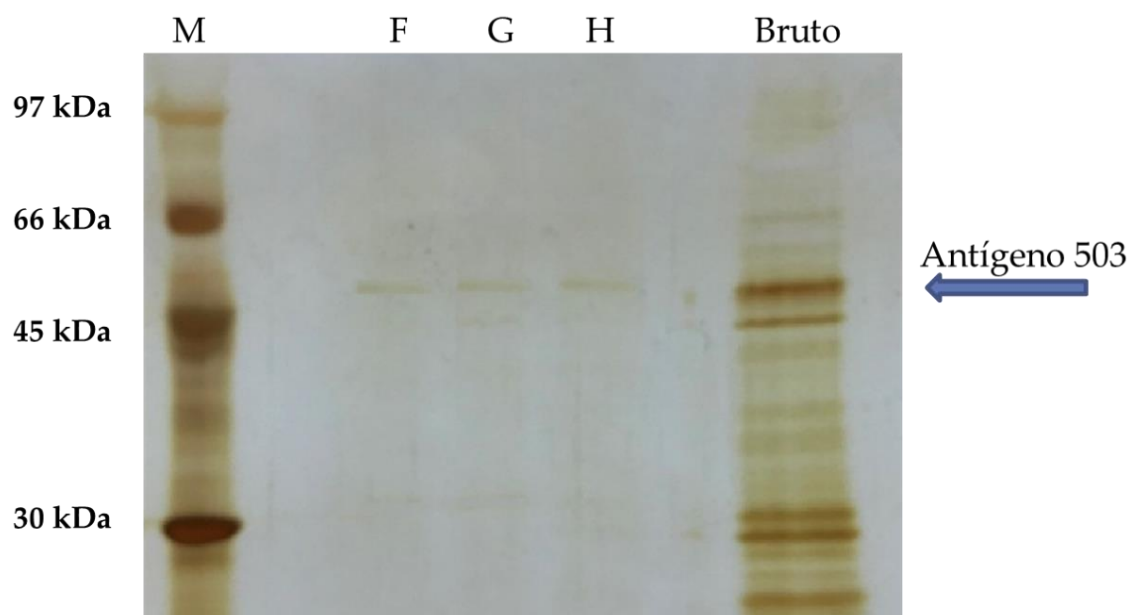
Figura 25. SDS-PAGE análise da expressão do antígeno 503 de *Leishmania i. chagasi* em *E. coli* induzido por diferentes concentrações de IPTG no meio 2xTY. Linha (M): Marcador; Linhas (A-E): proteína eluída na melhor condição dos cultivos A-E, Linha (Bruto): proteínas totais.



Pode-se observar, conforme a Figura 25, que a proteína eluída foi expressa em todos os cultivos realizados. A menor concentração de IPTG (0,01 mM) foi o suficiente para conseguir a expressão do antígeno 503, porém com a banda menos nítida. A maior concentração produzida da proteína recombinante foi de  $0,101 \pm 0,004$  g/L após 6 horas de cultivo induzido com 1,0 mM de IPTG.

A Figura 26 ilustra o gel quando se avaliou a influência da temperatura de cultivo na expressão do antígeno 503. Pode-se perceber que temperaturas entre 27 e 42 °C conseguiram realizar a expressão bem-sucedida da proteína alvo. A massa molecular do antígeno 503 induzido por IPTG foi de aproximadamente 56 kDa, corroborando com os resultados obtidos por Martins *et al.* (2006), Vaz (2011) e Sousa Junior *et al.* (2015).

Figura 26. SDS-PAGE análise da expressão do antígeno 503 de *Leishmania i. chagasi* em *E. coli* induzido por 1,0 mM de IPTG a diferentes temperaturas no meio 2xTY. Linha (M): Marcador; Linhas (F-H): proteína eluída na melhor condição dos cultivos F-H, Linha (Bruto): proteínas totais.



---

---

## **Capítulo 6**

### **Conclusões**

---

---

## 6. Conclusões

- Avaliando o crescimento celular do antígeno 503 com diferentes concentrações de indutor utilizadas, foi possível verificar que estas não foram suficientes para alterar o metabolismo de crescimento celular nem a estabilidade do plasmídeo.
- A maior concentração de indutor favoreceu a produção do ácido acético e consequentemente menor pH no meio de cultivo.
- Um mínimo de 0,01 mM de IPTG foi suficiente para expressar o antígeno 503. Porém a melhor produção da proteína foi utilizando a concentração de 1,0 mM do indutor.
- A toxicidade do IPTG promove um estresse metabólico e uma redução no crescimento do microrganismo, bem como a expressão do antígeno 503 é uma das causas da instabilidade do plasmídeo pQE-30 devido à carga imposta pela expressão da proteína recombinante.
- Foi possível verificar que a condição ótima de temperatura para crescimento celular da bactéria estudada foi de 37 °C.
- Temperaturas menores favorecem a retenção do plasmídeo pQE-30 em *E. coli* M15. Mas não favoreceram a produção do antígeno 503.
- A expressão do antígeno 503 foi confirmada por eletroforese, com a identificação da massa molecular de 56 kDa.

As condições ótimas de concentração de IPTG e temperatura de cultivo para a produção de antígeno 503 foram identificadas nos cultivos em incubador rotativo. Futuros trabalhos podem ser desenvolvidos em alta escala utilizando biorreatores, assim como realizar a modelagem da estabilidade.

---

---

## **Referências bibliográficas**

---

---



## Referências bibliográficas

AFONSO, M. S.; FERREIRA, S.; DOMINGUES, F. C.; SILVA, F. Resveratrol production in bioreactor: Assessment of cell physiological states and plasmid segregational stability. *Biotechnology Reports*, v. 5, p. 7-13, 2015.

ALBERTS, B. Fundamentos da biologia celular. 3. ed. Porto Alegre: Artmed. 2011.

ALVAR, J.; VELEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN BOER, M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*, 7(5), e35671, 2012.

ASSENBERG, R.; WAN, P. T.; GEISSE, S.; MAYR, L. M. Advances in recombinant protein expression for use in pharmaceutical research. *Current Opinion in Structural Biology*, v. 23, p. 393-402, 2013.

BALBAS, P. Understanding the art of producing protein and nonprotein molecules in *Escherichia coli*. *Molecular Biotechnology*, v. 19, p. 251-267, 2001.

BARAZZONE, G. C.; CARVALHO, R. J.; KRASCHOWETZ, S.; HORTA, A. C. L.; SARGO, C. R.; SILVA, A. J.; ZANGIROLAMI, T. C.; GOULART, C.; LEITE, L. C. C.; TANIZAKI, M. M.; GONÇALVES, V. M.; CABRERA-CRESPO, J. Production and purification of recombinant fragment of pneumococcal surface protein A (PspA) in *Escherichia coli*. *Procedia in Vaccinology*, v. 4, p. 27-35, 2011.

BHADURI, S. Effect of salt and acidic pH on the stability of virulence plasmid (pYV) in *Yersinia enterocolitica* and expression of virulence-associated characteristics. *Food Microbiology*, v. 28, p. 171-173, 2011.

BI, X.; LIU, L. F. DNA rearrangement mediated by inverted repeats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v.93, p. 819-823, 1996.

BINGLE, L. E. H.; THOMAS, C. M. Regulatory circuits for plasmid survival. *Current opinion in Microbiology*, v. 4, p. 194-200, 2001.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, v. 8, p. 93-99, 1987.

BOHAYCHUK, V. M.; BELKUM, M. J.; STILES, M. E.; MCMULLEN, L. M. Effect of low temperature on stability of  $\theta$ -type plasmids in *Carnobacterium maltaromaticum*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 280, p. 14-20, 2008.

BORNHORST, J. A.; FALKE, J. J. Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods in Enzymology*. v. 326, p. 245-254, 2000.

BOTELHO A. C. A.; NATAL, D. Primeira descrição epidemiológica da leishmaniose visceral em Campo Grande, Estado de Mato Grosso do Sul. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 42, p. 503-508, 2009.

BRESOLIN, I. T. L.; MIRANDA, E. A.; BUENO, S. M. A. Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) de biomoléculas: aspectos fundamentais e aplicações tecnológicas. *Química Nova*, v. 32, p. 1288-1296, 2009.

BROWN, T. A. Clonagem gênica e análise de DNA: uma introdução. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2003.

BUSTAMANTE FILHO, I. C. Clonagem, expressão e purificação de proteínas do plasma seminal bovino relacionadas à alta congelabilidade do sêmen. Tese (Doutorado em Zootecnia), Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

CARNES, A. E. Fermentation Design for the Manufacture of Therapeutic Plasmid DNA. *Bioprocess Technical*. v. 3, p. 36-42, 2005.

- CARVALHO, R. J.; CABRERA-CRESPO, J.; TANIZAKI, M. M.; GONÇALVES, V. M. Development of production and purification processes of recombinant fragment of pneumococcal surface protein A in *Escherichia coli* using different carbon sources and chromatography sequences. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 94, p. 683-694, 2012.
- CASPETA, L.; FLORES, N.; PÉREZ, N. O.; BOLÍVAR, F.; RAMÍREZ, O. T. The effect of heating rate on *Escherichia coli* metabolism, physiological stress, transcriptional response, and production of temperature-induced recombinant protein: a scale-down study. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 102, p. 468-482, 2009.
- CAVALCANTE, I. J. M.; VALE, M. R. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral (calazar) no Ceará no período de 2007 a 2011. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v.17, p. 911-924, 2014.
- CHAVES, R. V. A. Avaliação de dois clones de *Escherichia coli* recombinante quanto ao crescimento e expressão de antígenos de *Leishmania chagasi* (kmp11 e P36). Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2009.
- CHEN, H. C.; HWANG, C. F.; MOU, D. G. High-density *Escherichia coli* cultivation processes for hyperexpression of recombinant porcine growth hormone. *Enzyme and Microbial Technology* v. 14, p. 321-326, 1992.
- COLLINS, T.; AZEVEDO-SILVA, J.; COSTA, A.; BRANCA, F.; MACHADO, R.; CASAL, M. Batch production of a silk-elastin-like protein in *E. coli* BL21 (DE3): key parameters for optimization. *Microbial Cell Factories*, v. 12, p. 1-16, 2013.
- COSTA, C. H. N. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 44, p. 232-242, 2011.
- COTRIM, C. A.; GARRIDO, S. S.; TROVATTI, E.; MARCHETTO, R. Síntese, caracterização e estudos de interação de um análogo da antitoxina CcdA empregando fluorescência no estado estacionário. *Química Nova*, v. 33, p. 841-845, 2010.

CUI, Y.; MENG, Y.; ZHANG, J.; CHENG, B.; YIN, H.; GAO, C.; XU, P.; YANG, C. Efficient secretory expression of recombinant proteins in *Escherichia coli* with a novel actinomycete signal particle. *Protein Expression and Purification*, v. 129, p. 69-74, 2016.

DEANE, S. M.; RAWLINGS, D. E. Plasmid evolution and interaction between the plasmid addiction stability systems of two related broad-host-range IncQ-like plasmids. *Journal of Bacteriology*, v. 186, p. 2123-2133, 2004.

DINIZ, M. O.; FERREIRA, L. C. S. Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de vacinas. *Estudos avançados*. v. 24, n. 70, p. 1-12, 2010.

EINSFELDT, K.; SEVERO JÚNIOR, J. B.; ARGONDISO, A. P. C.; MEDEIROS, M. A.; ALVES, T. L.; ALMEIDA, R. V.; LARENTIS, A. L. Cloning and expression of protease ClpP from *Streptococcus pneumoniae* in *Escherichia coli*: Study of the influence of kanamycin and IPTG concentration on cell growth, recombinant protein production and plasmid stability. *Vaccine*, v. 29, p. 7136-7143, 2011.

ERTL, P. F.; THOMSEN, L. L.; Technical issues in construction of nucleic acid vaccines. *Methods*, v. 31, p. 199-206, 2003.

ETTINGER, N. A.; DUGGAL, P.; BRAZ, R. F.; NASCIMENTO, E. T.; BEATY, T. H.; JERONIMO, S. M. B.; PEARSON, R. D.; BLACKWELL, J. M.; MORENO, L.; WILSON, M. E. Genetic admixtures in Brazilians exposed to infection with *Leishmania i. Chagasi*. *Annals of Human Genetics*, v. 73, p. 304-313, 2009.

FINK, A. L. Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Folding and Design*. v. 3, p. 9-23, 1998.

FREITAS-JUNIOR, L. H.; CHATELAIN, E.; KIM, H. A.; SIQUEIRA-NETO, J. L. Visceral leishmaniasis treatment: what do we have, what do we need and how to deliver it? *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. v. 2, p. 11-19, 2012.

GALATI, E. A. B. Classificação de *Phlebotominae*. In EF Rangel, R Lainson, *Flebotomíneos do Brasil*, Fiocruz, p. 23-51, 2003.

GONTIJO, C. M.; MELO, M. N. Visceral leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. v. 7, p. 338-349, 2004.

GOYAL, D.; SAHNI, G.; SAHOO, D. K. Enhanced production of recombinant streptokinase in *Escherichia coli* using fed-batch culture. *Bioresource Technology*. v. 100, p. 4468-4474, 2009.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Impactos ambientais das plantas transgênicas: as evidências e as incertezas. *Revista Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável*, Posto Alegre, v. 2, n. 3, 2001.

HADJ, K. B.; GARGOURI, J.; GARGOURI, A. *In vitro* direct repeats-mediated deletion during PCR amplification. *Molecular Biotechnology*. v. 40, p. 39-45, 2008.

HAILU, T. One Health Approach Prospect for Integrated Control and Elimination of Visceral Leishmaniasis in Ethiopia: A Narrative Review Article, *Iranian Journal of Parasitology*. v. 11, p. 1-9, 2016.

HISS, H. Cinética de processos fermentativos. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. R (Coord.) *Biotechnologia Industrial*. São Paulo: Edgard Blucher, 2001.

HU, P.; HE, X.; ZHU, C.; GUAN, W.; MA, Y. Cloning and characterization of a ribosomal protein L23a gene from Small Tail Han sheep by screening of a cDNA expression library. *Meta Gene*. v. 2, p. 479-488, 2014.

JERÔNIMO, S. M.; DUGGAL, P.; BRAZ, R. F.; CHENG, C.; MONTEIRO, G. R.; NASCIMENTO, E. T.; MARTINS, D. R. An emerging peri-urban pattern of infection with *Leishmania i. chagasi*, the protozoan causing visceral leishmaniasis in northeast Brazil. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, v.36, n.6-7, p.443-9, 2004.

JHAMB, K.; SAHOO, D. K. Production of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli*: effects of process conditions and chaperone co-expression on cell growth and production of xylanase. *Bioresource Technology*, v. 123, p. 135-143, 2012.

KILIKIAN, B. V.; SUAREZ, I. D.; LIRIA, C. W.; GOMBERT, A.K. Process strategies to improve heterologous protein production in *Escherichia coli* under lactose or IPTG induction. *Process Biochemistry*, v. 35, p. 1019-1025, 2000.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.

LARENTIS, A. L.; NICOLAU, J. F. M. Q.; ESTEVES, G. S.; VARESCHINI, D. T.; ALMEIDA, F. V. R.; REIS, M. G.; GALLER, R.; MEDEIROS, M. A. Evaluation of pre-induction temperature, cell growth at induction and IPTG concentration on the expression of a leptospiral protein in *E. coli* using shaking flasks and microbioreactor. *BMC Research Notes*, p. 1-13, 2014.

LECINA, M.; SARRÓ, E.; CASABLANCAS, A.; GÒDIA, F.; CAIRÓ, J. J. IPTG limitation avoids metabolic burden and acetic acid accumulation in induced fed-batch cultures of *Escherichia coli* M15 under glucose limiting conditions. *Biochemical Engineering Journal*, v. 70, p. 78-83, 2013.

LEITÃO, A. L. O. S. Avaliação de métodos de rompimento celular e de diferentes metais imobilizados em resina *Streamline Chelating* para purificação do antígeno 503 de *Leishmania i. chagasi*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2017.

LI, Z. *E. coli* fermentation for the production of sialic acid. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade de Ottawa, 2014.

LIMA, W. J. N. Produção de proteínas recombinantes utilizando *Escherichia coli* em cultivos em alta densidade celular. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Estadual de Campinas, 2004.

LIMA, I.D.; QUEIROZ, J. W.; LACERDA, H.G.; QUEIROZ, P.V.; PONTES, N.N.; BARBOSA, J.D.; MARTINS, D.R.; WEIRATHER, J.L.; PEARSON, R.D.; WILSON, M.E.; JERONIMO, S.M. *Leishmania infantum chagasi* in northeastern Brazil: asymptomatic infection at the urban perimeter. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 86, p. 99-107, 2012.

LINDEN, R. Terapia gênica: o que é, o que não é e o que será. *Estudos avançados*. v. 24, p. 31-69, 2010.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUG, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol Chem*, v. 193, p. 265-275, 1951.

LU, Y. R.; WARNER, M.; SEDLAK, M.; HO, N.; MOSIER, N. S. Comparison of glucose/xylose cofermentation of poplar hydrolysates processed by different pretreatment Technologies. *Biotechnology Progress*. v. 25, p. 349-356, 2009.

MALIK, A.; ALSENAIDY, A. M.; ELROBH, M.; KHAN, W.; ALANAZI, M. S.; BAZZI, M. D. Optimization of expression and purification of HSAP6 protein from *Camelus dromedarius* in *E. coli*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, v. 23, p. 410-419, 2016.

MARBACH, A.; BETTENBROCK, K. lac operon induction in *Escherichia coli*: Systematic comparison of IPTG and TMG induction and influence of the transacetylase LacA. *Journal of Biotechnology*. v. 57, p. 82-88, 2012.

MARISCH, K.; BAYER, K.; CSERJAN-PUSCHMANN, M.; LUCHNER, M.; STRIEDNER, G. Evaluation of three industrial *Escherichia coli* strains in fed-batch cultivations during high-level SOD protein production. *Microbial Cell Factories*, p. 58-69, 2013.

MARTINS, D. R.; JERÔNIMO, S. M.; DONELSON, J. E.; WILSON, M. E. *Leishmania chagasi* T-cell antigens identified through a double library screen. *Infection and Immunity*. v. 74, p. 6940-6948, 2006.

MIKAMI, Y.; YONEDA, H.; TATSUKAMI, Y.; AOKI, W.; UEDA, M. Ammonia production from amino acid-based biomass-like sources by engineered *Escherichia coli*. *AMB EXPRESS*, p. 77-83, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral*. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica*. -1. ed., 5 reimpr. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 120 p.

MIT OPEN COURSE WARE. Induce protein and evaluate DNA. *Laboratory Fundamentals in Biological Engineering*, Module 2, Day 5, 2010.

NGUYEN, M. T. The effect of temperature on the growth of the bacteria *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . *Saint Martin's University Biology Journal*, v. I, p. 87-94, 2006.

NOOR, R.; ISLAM, Z.; MUNSHI, S. K.; RAHMAN, F. Influence of Temperature on *Escherichia coli* Growth in Different Culture Media. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, v. 7, p. 899-904, 2013.

NORSYAHIDA, A.; RAHMAH, N.; AHMAD, R. M. Y. Effects of feeding and induction strategy on the production of Bm R1 antigen in recombinant *E. coli*. *Letters in Applied Microbiology*, v. 49, p. 544-550, 2009.

O'KENNEDY, R. D.; PATCHING, J. W. Effects of medium composition and nutrient limitation on loss of the recombinant plasmid pLG669-z and beta-galactosidase expression by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. v. 18, p. 319-325, 1997.

O'KENNEDY, R. D.; WARD, J. M.; KESHAVARZ-MOORE, E. Effects of fermentation strategy on the characteristics of plasmid DNA production. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. v. 37, p. 83-90, 2003.



OLAOFE, O. A.; BURTON, S. G.; COWAN, D. A.; HARRISON, S. T. L.; Improving the production of a thermostable amidase through optimising IPTG induction in a highly dense culture of recombinant *Escherichia coli*. *Biochemical Engineering Journal*, v. 52, p. 19-24, 2010.

OLIVEIRA, P. H.; PRAZERES, D. M.; MONTEIRO, G. A. Deletion formation mutations in plasmid expression vectors are unfavored by runaway amplification conditions and differentially selected under kanamycin stress. *Journal of Biotechnology*. v. 143, p. 231-238, 2009.

PACE, D. Leishmaniasis. *Journal of Infection*, v. 69, p. 10-18, 2014.

PAPANEOPHYTOU, C. P.; KONTOPIDIS, G. Statistical approaches to maximize recombinant protein expression in *Escherichia coli*: A general review. *Protein Expression and Purification*, v. 94, p. 22-32, 2014.

PATRA, A. K.; MUKHNOPADHYAY, R.; MUKHIJA, R.; KRISHNAN A.; GARG, L. C.; PANDA, A. K. Optimization of Inclusion Body Solubilization and Renaturation of Recombinant Human Growth Hormone from *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, v. 18, p. 182-192, 2000.

PEREZ, F. S. A. Influência da temperatura de cultivo na expressão de proteínas recombinantes de interesse terapêutico no espaço periplásmico bacteriano, utilizando o promotor lambda PL. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear), Universidade de São Paulo, 2015.

PILAREK, M.; GLAZIRINA, J.; NEUBAUER, P. Enhanced growth and recombinant protein production of *Escherichia coli* by a perfluorinated oxygen carrier in miniaturized fed-batch cultures. *Microbial Cell Factories*, v. 10, p. 1-9, 2011.

POPOV, M.; PETROV, S.; NACHEVA, G.; IVANOV, I.; REICHL, U. Effects of a recombinant gene expression on ColE1-like plasmid segregation in *Escherichia coli*, *BMC Biotechnonology*, p.11-18, 2011.

RATTANABUMRUNG, O.; SANGADKIT, V.; SUPANIVATIN, P.; THIPAYARAT, A. Kinetics of *E. coli* colony area expansion and color development in Chromocult® Coliform Agar (CCA) under different incubation conditions. *Procedia Engineering*, v. 32, p. 134-140, 2012.

RINAS, U. Synthesis rates of cellular proteins involved in translation and protein folding are strongly altered in response to overproduction of basic fibroblast growth factor by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress*. v. 2, p. 196-200, 1996.

ROZENDO, A. S.; BRAZ, L. C. C.; OLIVEIRA, F. J. C.; ALMEIDA, E. S.; JÚNIOR, F. C. S.; GUIMARÃES, J. R.; NÓBREGA, F. F. F.; VAZ, M. R. F. Estratégias de indução na produção de antígenos recombinantes de *Leishmania chagasi*. *Revista Saúde e Ciência*, v. 3, p. 174-188, 2014.

RUDOLPH, B.; GEBENDORFER, K. M.; BUCHNER, J.; WINTER, J. Evolution of *Escherichia coli* for growth at high temperatures. *Journal of Biological Chemistry*. v. 285, p. 19029-19034, 2010.

SAHDEV, S.; KHATTAR, S. K.; SAINI, K. S. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Molecular and Cellular Biochemistry*. v. 307, p. 249-264, 2008.

SANTOS, M. P. Avaliação da temperatura de indução e de fontes de nitrogênio na produção de proteína de superfície de *Streptococcus pneumoniae* em *Escherichia coli* recombinante. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de São Carlos, 2012.

SELVAPANDIYAN, A.; DEY, R.; GANNAVARAM, S.; NAOUAR-LAKHAL, I.; DUNCAN, R.; SALOTRA, P.; NAKHASI, H. L. Immunity to Visceral Leishmaniasis Using Genetically Defined Live-Attenuated Parasites. *Journal of Tropical Medicine*. v.1, p.1-12, 2012.

SHOJAOSADATI, S. A.; KOLAEI, S. M. V.; BABAEIPOUR, V.; FARNOUD, A. M. Recent advances in high cell density cultivation for production of recombinant protein. Review Article. *Iranian Journal of Biotechnology*, v. 6, p. 63-84, 2008.

SILVA, F.; PASSARINHA, L.; SOUSA, F.; QUEIROZ, J. A.; DOMINGUES, F. C. Influence of growth conditions on plasmid DNA production. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. v. 19, p. 1408-1414, 2009.

SILVA, F.; QUEIROZ, J. A.; DOMINGUES, F. C. Evaluating metabolic stress and plasmid stability in plasmid DNA production by *Escherichia coli*. *Biotechnology Advances*, v. 30, p. 691-708, 2012.

SINGH, O. P.; HASKER, E.; BOELAERT, M.; SUNDAR, S. Elimination of visceral leishmaniasis on the Indian subcontinent. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 16, p. 304-309, 2016.

SINGH, S. M.; PANDA, A. K. Solubilization and Refolding of Bacterial Inclusion Body Proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 99, p. 303-310, 2005.

SINGH, B.; SUNDAR, S. Leishmaniasis: vaccine candidates and perspectives. *Vaccine*, v. 30, p. 3834-3842, 2012.

SOUSA JUNIOR, F. C.; VAZ, M. R. F.; PADILHA, C. E. A.; CHIBÉRIO, A. S.; MARTINS, D. R. A.; MACEDO, G. R.; SANTOS, E. S. Recovery and purification of recombinant 503 antigen of *Leishmania infantum chagasi* using expanded bed adsorption chromatography. *Journal of Chromatography B*, v. 986, p. 1-7, 2015.

STRYJEWSKA, A.; KIEPURA, K.; LIBROWSKI, T.; LOCHYNSKI, S. Biotechnology and genetic engineering in the new drug development. Part I. DNA technology and recombinant proteins. *Pharmacological Reports*. v. 65, p. 1075-1085, 2013.

SUÁREZ, D.C.; LIRIA, C.W.; KILIKIAN, B.V. Effect of yeast extract on *Escherichia coli* growth and acetic acid production. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 14, p. 331-335, 1998.

SUMMERS, D. K.; SHERRATT, D. J. Multimerization of high copy number plasmids causes instability: ColE1 encodes a determinant essential for plasmid monomerization and stability. *Cell*, v. 36, p. 1097-1103, 1984.

THE QIA EXPRESSIONIST. A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins, Qiagen, 2003.

TIAN, H.; TANG, L.; WANG, Y.; WANG, X.; GUAN, L.; ZHANG, J.; WU, X.; LI, W.. Lactose induction increases production of recombinant keratinocyte growth factor-2 in *Escherichia coli*. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. v. 17, p. 123-129, 2011.

TOMAZETTO, G.; MULINARI, F.; STANISÇUASKI, F.; SETTEMBRINI, B.; CARLINI, C. R.; AYUB, M. A. Z. Expression kinetics and plasmid stability of recombinant *E. coli* encoding urease-derived peptide with bioinsecticide activity. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 41, p. 821-827, 2007.

TRIPATHI, N.K.; SATHYASEELAN, K.; JANA A.M.; RAO, P.V.L. High yield production of heterologous proteins with *Escherichia coli*. *Defence Science Journal*, v. 59, p. 137-146, 2009.

VALDEZ-CRUZ, N. A.; CASPETA, L.; PÉREZ, N. O.; RAMÍREZ, O. T.; TRUJILLO-ROLDÁN, M. A. Production of recombinant proteins in *E. coli* by the heat inducible expression system based on the phage lambda pL and/or pR promoters. *Microbial Cell Factories*. p. 9-18, 2010.

VAZ, M. R. F. Influência das condições de cultivo na produção de antígenos recombinantes de *Leishmania i. chagasi* utilizando *Escherichia coli* M15 cultivada em incubador rotativo e biorreator. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2011.

VAZ, M. R. F.; SOUSA JUNIOR, F. C.; COSTA, L. M. R.; SANTOS, E. S.; MARTINS, D. R. A.; MACEDO, G. R. Optimization of culture médium for cell growth and expression of

648 antigen from *Leishmania infantum chagasi* in recombinant *Escherichia coli* M15. *Annals of Microbiology*, v. 65, p. 1607-1613, 2015.

VIDAL, L.; FERRER, P.; ALVARO, G.; BENAIGES, M. D.; CAMINAL, G. Influence of induction and operation mode on recombinant rhamnulose 1-phosphate aldolase production by *Escherichia coli* using T5 promoter. *Journal of Biotechnology*, v. 118, p. 75-87, 2005.

WANDREY, G.; BIER, C.; BINDER, D.; HOFFMANN, K.; JAEGER, K. E.; PIETRUSZKA, J.; DREPPER, T.; BUCHS, J. Light-induced gene expression with photocaged IPTG for induction profiling in a high-throughput screening system. *Microbial Cell Factories*. v. 15, 63, 2016.

WANG, H.; WANG, F.; WANG, W.; YAO, X.; WEI, D.; CHENG, H.; DENG, Z. Improving the expression of recombinant proteins in *E. coli* BL21 (DE3) under acetate stress: an alkaline pH shift approach. *PLoS ONE*, v. 9, p. e112777, 2014.

WOO, J. M.; YANG, K. M.; KIM, S. U.; BLANK, L. M.; PARK, J. B. High temperature stimulates acetic acid accumulation and enhances the growth inhibition and ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* under fermenting conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*. p. 6085-6094, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Leishmaniasis: background information. Disponível em: <[www.who.int/topics/leishmaniasis/en](http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en)>. Acesso em: 5 de dezembro de 2017.

XIMENES, M. F.F. M.; SILVA, V. P. M.; QUEIROZ, PAULA V. S.; M. M. REGO, M.M.; CORTEZ, A. M.; BATISTA, L. M. M.; MEDEIROS, A. S.; JERONIMIO, S.M.B. Flebotomíneos (*Diptera: Psychodidae*) e Leishmanioses no Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil - Reflexos do Ambiente Antrópico. *Neotropical Entomology*, v. 36, p. 128-137, 2007.

XU, J.; LI, W.; WU, J.; ZHANG, Y.; ZHU, Z.; LIU, J.; HU, Z. Stability of plasmid and expression of a recombinant gonadotropin-releasing hormone (GnRH) vaccine in *Escherichia coli*, *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 73, p. 780-788, 2006.

XUE, W.; FAN, D.; SHANG, L.; Effects of acetic acid and its assimilation in fed-batch cultures of recombinant *Escherichia coli* containing human-like collagen cDNA. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 109, p. 257-261, 2010.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. *Biologia molecular básica*. 5. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2014.

ZANFONATO, K. Produção de poli (3-hidroxibutirato) por linhagens de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  e JM101 recombinantes. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos. 96p, 2012.

ZHANG, H.; ZHENG, Y.; LIU, Q.; TAO, X.; ZHENG, W.; MA, X.; WEI, D. Development of a fed-batch process for the production of anticancer drug TATm-survivin(T34A) in *Escherichia coli*. *Biochemical Engineering Journal*, v. 43, p. 163-168, 2009a.

ZHANG, X. X.; ZHANG, T.; FANG, H. H. P. Antibiotic resistance genes in water environment. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 82, p. 397-414, 2009b.

ZHAO, J., YAO, S. LIN, D. Adsorbents for expanded bed adsorption: preparation and functionalization. *Chinese Journal of Chemical Engineering* v. 17, p. 678-687, 2009.

---

---

## Apêndice

---

---

Resultado do teste de Tukey para a Figura 11 em que letras iguais representam que não há diferença estatística significativa.

Tempo (h)	Cultivo A	Cultivo B	Cultivo C	Cultivo D	Cultivo E
0	a	a	a	a	a
0,5	b	b	b	b	b
2	c	c	d	c	c
4	e	f	e	e	g
6	h	i	h	h	h
8	j	j	j	l	j
10	m	n	n	n	n
12	o	o	p	q	o

Resultado do teste de Tukey para a Figura 12 em que letras iguais representam que não há diferença estatística significativa.

Tempo (h)	Cultivo A	Cultivo B	Cultivo C	Cultivo D	Cultivo E
12	a	b	c	b	c

Resultado do teste de Tukey para a Figura 14 em que letras iguais representam que não há diferença estatística significativa.

Tempo (h)	Cultivo A	Cultivo B	Cultivo C	Cultivo D	Cultivo E
0	a	a	a	a	a
0,5	b	b	b	b	b
2	c	c	c	c	c
4	*	d	d	d	d
6	*	e	e	e	e
8	*	f	f	f	f
10	g	g	g	g	g
12	h	h	h	h	h



